



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

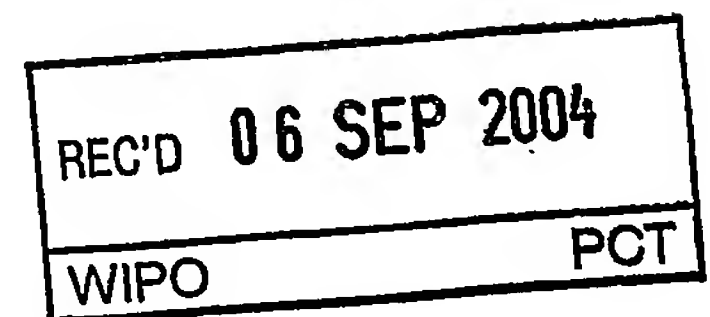


Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2003 A 000125 del 21.03.2003

IT | 04 | 133

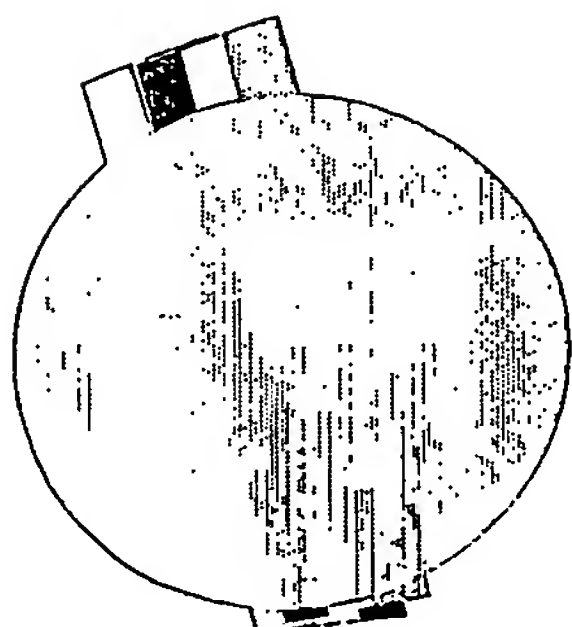
Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma li.....1 SET. 2004...



IL FUNZIONARIO

....Giampietro Carlotto...
Giampietro Carlotto



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **MINCHIOTTI Gabriella** RG PF
Residenza **NAPOLI - IT** codice **MNCGRL65A66F839V**
2) Denominazione **PERSICO Maria** PF
Residenza **NAPOLI - IT** codice **PRSMRA50E54F839G**

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome **CAPASSO Olga, DE SIMONE Domenico ed altri** cod. fiscale
denominazione studio di appartenenza **DE SIMONE & PARTNERS SPA**
via **Vincenzo Bellini** n. **20** città **ROMA** cap **00198** (prov) **RM**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario **Vedi sopra.**

via n. città cap (prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) gruppo/sottogruppo

"METODO PER PROMUOVERE IL DIFFERENZIAMENTO DI CARDIOMIOCITI"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **MINCHIOTTI, Gabriella** 3) **PARISI, Silvia**
2) **PERSICO, Maria** 4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE
					Data N° Protocollo
1) Nessuna.					
2) 					

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna.

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)	1	PROV.	n. pag.	34	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obb.)
Doc. 2)	1	PROV.	n. tav.	07	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3)	1	RIS			dichiarazione sostitutiva della lettera d'incarico, per la quale si è incaricato l'Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Doc. 4)	0	RIS			designazione inventore
Doc. 5)	0	RIS			documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6)	0	RIS			autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7)	0				nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale: **Euro 291,80.=** obbligatorio

COMPILATO IL **21/03/2003**

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Olga CAPASSO

CONTINUA S/NO **SI**

della **DE SIMONE & PARTNERS SPA**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO **SI**

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA **ROMA**

RM 2003 A 000125

codice **58**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg. A

L'anno

DUEMILATRE

il giorno

VENTUNO

del mese di

MARZO

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **01** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

timbro
dell'ufficio

L'Ufficiale Rogante

Giussep

FOGLIO AGGIUNTIVO n. di totali DOMANDA N. REG. A

A. RICHIEDENTE (I)

03 Denominazione **PARISI, Silvia** RM 2003 A 000125 N.G.
 Residenza **FRATTAMAGGIORE (NA)** codice **PRSSLV74P70F839Z**

☐ Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

☐ Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

☐ Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

☐ Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

☐ Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

☐ Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

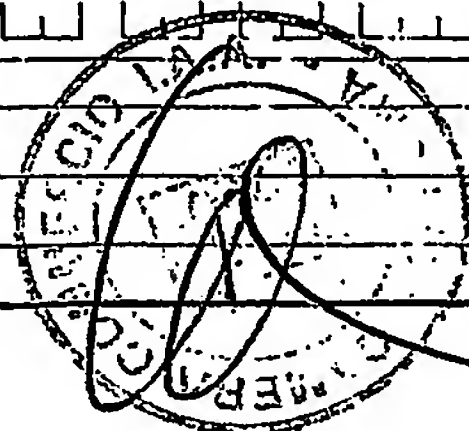
F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

SCIOGLIMENTO RISERVE	
Data	N° Protocollo
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

IRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) **Olga CAPASSO**
della DE SIMONE & PARTNERS SPA
Olga Capasso

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA RM 2003 A 000125 REG. A

NUMERO BREVETTO _____

DATA DI DEPOSITO 2/1/2003DATA DI DEPOSITO 1/1

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione MINCHIOTTI Gabriella - PERSICO Maria e PARISI Silvia
Residenza Via Ugo Ricci 19 NAPOLI Via Camillo de Nardis 10 NAPOLI Via Roma 136 FRATTAMAGGIORE (NA)

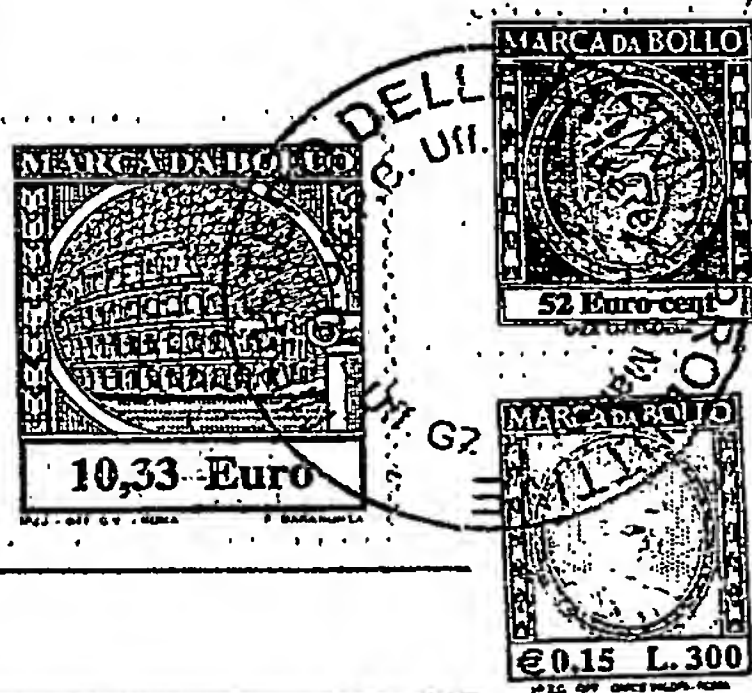
D. TITOLO "METODO PER PROMUOVERE IL DIFFERENZIAMENTO DI
CARDIOMIOCITI".

Classe proposta (sez./cl./scl) _____

(gruppo/sottogruppo) _____

L. RIASSUNTO

E' descritto un metodo per indurre cellule staminali a differenziare in cardiomiociti che comprende l'esposizione per un tempo e in quantità efficaci di una proteina della famiglia EGF-CFC o suoi derivati aventi almeno i domini EGF e CFC; e composizioni per uso terapeutico per il trattamento di deficienze cardiache, comprendenti una quantità terapeuticamente efficace di una proteina o derivato di essa, avente almeno i domini EGF e CFC di una proteina della famiglia EGF-CFC.



M. DISEGNO

RM 2003 A 000125
DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale a titolo:

"Metodo per promuovere il differenziamento di cardiomiociti"

a nome: GABRIELLA MINCHIOTTI, SILVIA PARISI, MARIA PERSICO

inventori: gli stessi Richiedenti

Campo dell'invenzione

L'invenzione concerne un metodo per promuovere il differenziamento di cardiomiociti. Più in particolare l'invenzione riguarda un metodo che utilizza la proteina Cripto o suoi analoghi o derivati funzionali. per indurre cellule staminali a differenziare in cardiomiociti. Nell'ambito della presente invenzione le cellule staminali comprendono sia le cellule staminali embrionali che derivate da adulto

La famiglia di proteine EGF-CFC (comprendenti Cripto, sia umana che di topo, che di pollo, cryptic, oep, FRL-1, Minchiotti et al. 2001) è coinvolta nello sviluppo del miocardio dei vertebrati, anche se il meccanismo di azione non è noto. Gli autori della presente invenzione hanno investigato il ruolo della proteina Cripto nella cardiomiogenesi, e hanno trovato che sia l'inizio che la durata dell'esposizione a Cripto sono cruciali per indurre il differenziamento di cellule embrionali staminali (ES) in cardiomiociti, indicando che Cripto agisce in una fase precoce. Inoltre Gli autori hanno riportato che l'induzione di Cripto attiva una proteina intracellulare che funge da trsduttore del segnale extracellulare, Smad2 (Adamson et al., 2002) e che la superespressione delle forme attivate del recettore Alk4 di tipo I

compensa per la mancanza del segnale di Cripto. Entrambi i domini EGF-CFC sono richiesti nella cardiomiogenesi.

L'invenzione trova una vantaggiosa applicazione come stimolatore di cellule staminali per i trapianti per il trattamento di malattia degenerative come l'infarto del miocardio, (Min JY, et al., 2002). Come è noto, il cuore adulto ha una capacità rigenerativa limitata, pertanto qualsiasi perdita cellulare significativa, come quella che avviene durante un procedimento di infarto estensivo, è per lo più irreversibile e può portare ad un progressivo deterioramento della funzione cardiaca ed allo sviluppo di una insufficienza cardiaca (Gepstein et al., 2002). Sia le cellule staminali (ES) umane che di topo differenziano spontaneamente in vitro in cardiomiociti, con la tecnica dei Corpi Embrioidi (EB); tuttavia specifici stimoli biochimici non sono noti. Inoltre le cellule di cardiomiociti sono solo una minoranza della popolazione cellulare degli EB. L'introduzione di geni di controllo dello sviluppo in cellule staminali rappresenta una strategia vantaggiosa per direzionare il loro differenziamento, sebbene vi siano diversi effetti indesiderati, dovuti alla varianza clonale, alla dipendenza dal promotore ed alla capacità di alcune cellule staminali di reprimere l'espressione di transgeni espressi ectopicamente (Boehler et al., 2002). Per superare questo problema risulta evidente l'esigenza di identificare molecole secrete in grado di indurre il differenziamento delle cellule staminali verso la linea cardiaca. Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo per indurre cellule staminali a differenziare in cardiomiociti che comprende l'esposizione per un tempo e in quantità efficaci di una proteina della famiglia EGF-CFC o suoi derivati aventi almeno i domini EGF e CFC.

Preferibilmente i domini derivano dalla sequenza della proteina Cripto, ancora più preferibilmente dalla sequenza della proteina Cripto umana, alternativamente dalla sequenza della proteina Cripto di topo.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione una composizione per uso terapeutico per il trattamento di deficienze cardiache, comprendente una quantità terapeuticamente efficace di una proteina o derivato di essa, avente almeno i domini EGF e CFC di una proteina della famiglia EGF-CFC. Preferibilmente la proteina ha almeno i domini EGF e CFC della proteina Cripto, più preferibilmente i domini derivano dalla sequenza della proteina Cripto umana, alternativamente i domini derivano dalla sequenza della proteina Cripto di topo.

La presente invenzione verrà ora descritta in suoi esempi non limitativi in riferimento alle seguenti figure:

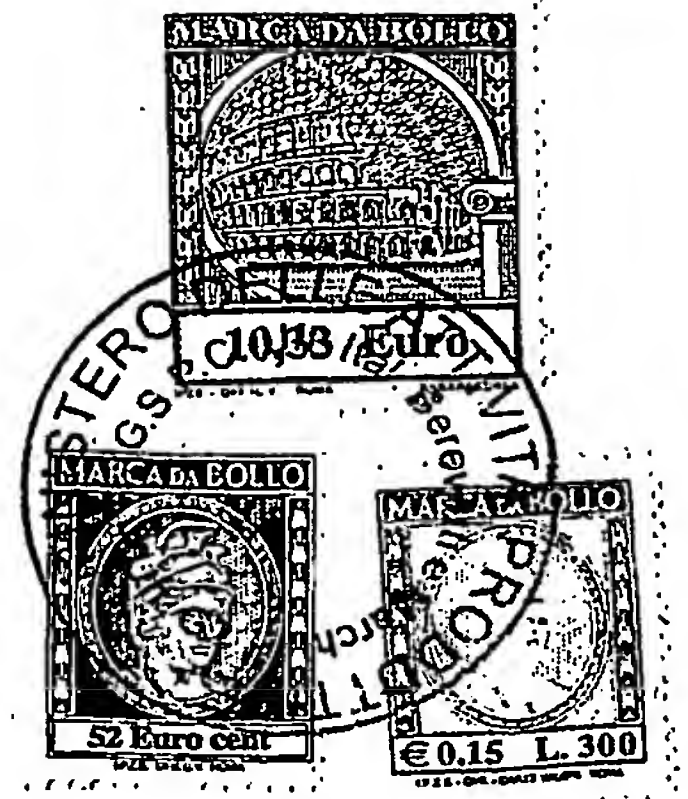
Figura 1. Rappresentazione schematica del protocollo sperimentale utilizzato per il differenziamento di cellule ES in cardiomiociti (adattato da Maltsev et al., 1993).

Figura 2. Dissezione funzionale di Cripto

(A) Rappresentazione schematica delle proteine dedotte dal cDNA di *cripto*. EGF: (Epidermal Growth Factor); CFC: (Cripto, FrL1, Cryptic); Minchiotti et al., 2001 S.P.: peptide segnale.

(B) Determinazione dei domini minimi richiesti per l'attività di Cripto nel differenziamento dei cardiomiociti. Sia Cripto wt che mutanti di delezione sono stati trasfettati in cellule ES Cripto^{-/-}; un vettore vuoto è stato usato come controllo. La percentuale di EB con aree di contrazione ritmica evidenziabili al microscopio ottico è stata individuata

dal giorno 8 al giorno 12. I dati sono rappresentativi di almeno due esperimenti indipendenti.



(C) Analisi Western blot di terreni condizionati da cellule 293EBNA trasfettate con i mutanti di delezione del cDNA di *cripto*. Le cellule erano co-trasfettate con il vettore di espressione *Plgf* come controllo interno (si veda Mat. e Met.). Colonna 1: EGF-CFC; colonna 2: EGF lungo; colonna 3: vettore. La massa molecolare degli standard proteici è indicata (kDa).

(D) Espressione di geni specifici cardiaci MLC2v e α MHC durante il differenziamento *in vitro* di cellule ES wt o *Cripto*^{-/-}. La RT-PCR è stata attuata su RNA, estratti da cellule ES non differenziate o da EB durante un periodo di differenziamento di 10 giorni (giorni da 2 a 10). L'espressione del gene HPRT è stata analizzata come controllo interno.

(E) Livelli di espressione di RNA dei geni MLC2v e α MHC cardiaci durante il differenziamento *in vitro* di cellule ES *Cripto*^{-/-} che superesprimono *cripto* wt o mutanti di delezione. L'RNA era purificato ai giorni 5, 7 e 10 del protocollo di differenziamento e sottoposto a RT-PCR. Il vettore vuoto era utilizzato come controllo interno. I risultati sono rappresentativi di due programmi di differenziamento indipendenti.

Figura 3. Profilo di espressione di *Cripto* durante il differenziamento *in vitro* di cellule ES.

Lisati totali di cellule ES non differenziate o di EB a diversi giorni dal differenziamento (da 2 a 7 giorni), derivati da cellule ES RI (wt) o DE7 (*Cripto*^{-/-}) sono stati raccolti in tamponi di lisi ed analizzati per Western blot utilizzando un antisiero policlonale anti-peptide *Cripto* (Minchiotti et

al., 2000). I dati sono stati normalizzati per il livello di espressione della Porina

Figura 4. Dinamica del segnale di Cripto durante il differenziamento dei cardiomiociti

- A) Definizione dell'attività temporale di Cripto. Percentuale di EB Cripto^{-/-} contenenti aree contrattili dopo aggiunta della proteina Cripto ricombinante. 10 µg/ml di proteina Cripto solubile sono stati aggiunti agli EB ad intervalli di 24 ore dal tempo 0 del saggio di differenziamento *in vitro* (si veda schema in Figura 1). Il numero di EB contenenti aree contrattili è stato indagato dai giorni 8 ai 12 del differenziamento *in vitro*.
- B) Attività dose-dipendente della proteina Cripto. EB Cripto^{-/-} di 2 giorni sono stati trattati con quantità crescenti di proteina cripto solubile ricombinante per 24 ore e poi coltivati per i restanti giorni. La comparsa di aree contrattili è stata indagata dal giorno 8 al 12 del differenziamento *in vitro*.
- C) Durata del segnale di Cripto. EB Cripto^{-/-} di due giorni sono stati trattati con 10 µg/ml di proteina Cripto solubile ricombinante per tempi diversi: 1h, 12h, 24h, per 3 giorni; gli EB sono stati poi lavati per rimuovere la proteina e coltivati per i restanti giorni. Le cellule sono state esaminate per il differenziamento cardiaco come sopra descritto. In tutti i casi due cloni ES Cripto^{-/-} indipendenti (DE7 e DE14) sono stati utilizzati. I dati sono rappresentativi di almeno due esperimenti indipendenti.

Figura 5. Attivazione di Smad2 in aggregati cellulari Cripto^{-/-} trattati con la proteina Cripto ricombinante.

EB Cripto^{-/-} di due giorni sono stati privati del siero per 3 ore e poi trattati con 10 µg/ml di proteina Cripto ricombinante per 30', 60', 120' o non trattati come indicato. L'attivazione di Smad2 è stata rivelata mediante analisi di Western blot utilizzando un anticorpo anti-fosfo-Smad2. I livelli di Smad2 totale sono stati comparati.

Figura 6. Profilo di espressione di Nodal, Alk4 e ActRIIB durante il differenziamento dei cardiomiociti e loro effetto sull'induzione cardiaca.

(A) Livelli di espressione dell'RNA dei geni Nodal, Alk4 e ActRIIB durante il differenziamento *in vitro* di cellule ES. L'analisi RT-PCR è stata effettuata su RNA estratti da cellule ES non differenziate o da EB (sia wt che Cripto^{-/-}) per un periodo di differenziamento di 10 giorni (da giorno 2 a 10). Il gene HPRT è stato usato come controllo interno.

(B) Analisi mediante Western Blot di lisati totali da cellule 293EBNA trasfettate con il gene Alk4 umano wt o la sua forma "Ha-tagged" attivata in maniera costitutiva (ca). Le cellule erano cotrasfettate con il vettore di espressione Jùn-HA come controllo interno. Un anticorpo monoclonale anti-HA è stato utilizzato per evidenziare i livelli di proteina.

(C) Profilo di espressione dell' RNA del gene αMHC durante il differenziamento di cellule ES Cripto^{-/-} (giorni 5, 7 e 10) che superesprimono Alk4 o Taram-A wt o in forma attivata. Il gene HPRT è stato usato come controllo interno.

Figura 7. Identificazione delle porzioni necessarie di Cripto per l'induzione e il differenziamento cardiaco.

Rappresentazione schematica di Wt e mutanti di cripto.

(A) Analisi Western blot di lisati totali da cellule 293EBNA trasfettate con Cripto wt o suoi mutanti. Il vettore di espressione Jun-HA è stato cotrasfettato come controllo interno. Per evidenziare i livelli di proteina sono stati utilizzati anticorpi policlonali anti-Cripto o monoclonali anti-HA.

(B) Livelli di espressione dell'RNA dei geni cardiaci α MHC e MLC2v durante il differenziamento *in vitro* di cellule ES Cripto^{-/-} (giorni 5, 7 e 10) che superesprimono cripto wt o suoi mutanti. Il livello di espressione del gene HPRT è stato analizzato come controllo interno.

Materiali e Metodi

Plasmidi e mutanti

Il vettore pallino β A è derivato dal vettore di espressione pallino (gentilmente fornito dalla Dr. S. Chiocca) con le seguenti modifiche: il promotore del virus CMV è stato exciso come frammento di DNA EcoRI/Hind III e sostituito con un frammento di DNA Sall/HindIII comprendente il promotore per la α -actina di pollo seguita dalla sequenza 3' del gene per la β -globina di coniglio (dal vettore pCXN2; Niwa et al., 1991). Altri vettori plasmidici possono essere utilizzati a condizione che il cDNA da esprimere sia sotto il controllo di sequenze promotrici della trascrizione e di sequenze stabilizzatrici al 3' attive in cellule staminali, come il promotore della β -actina e la sequenza al 3' della β -globina. Siti di restrizione sono stati trattati con polimerasi di Klenow. Tutti i mutanti derivati di *cripto* descritti (sia di delezione che di sostituzione) sono stati ottenuti con il metodo basato su PCR utilizzando il cDNA completo di Cripto e oligonucleotidi appropriati come già descritto (Minchiotti et al., 2001). Cripto-His qui rinominato "Cripto

secreto" e i derivati EGF-CFC sono stati già descritti (Minchiotti et al., 2001). I cDNA per: *cripto* EGF lungo (dal nucleotide -5 al nucleotide +288 del cDNA di *cripto*, Dono et al., 1993) e per *cripto* EGF corto (dal nucleotide -5 al +75 fusi ai nucleotidi +157/+288 dei cDNA di *cripto*), Alk4 wt e quello attivato (ca), Taram-A wt e quello attivato (ca), sono stati subclonati nel vettore β A pallino per l'espressione in cellule ES. Quando necessario i siti di restrizione sono stati trattati con polimerasi di Klenow.

Colture cellulari e differenziamento ES

Cellule umane da rene embrionale 293 (ATTC, CRL-1573) e 293T (ATCC, CRL-11268) sono state coltivate in terreno di Dulbecco modificato da Eagle (Celbio) con 10% siero fetale bovino (Euroclone), 50 U/ml di penicillina e 50 U/ml di streptomicina (GIBCO).

Le linee cellulari ES RI (cellule staminali embrionali di topo wild-type, Nagy et al., 1993) e *Cripto*^{-/-}, DE7 e DE14, sono state utilizzate. *Cripto*^{-/-} DE7 e DE14 derivano da trasfezione di due cloni indipendenti ES *Cripto*^{+/-} (Xu et al., 1999). Cellule ES wt e *Cripto*^{-/-} sono state mantenute allo stato indifferenziato in coltura con uno strato di fibroblasti embrionali di topo, trattati con mitomicina C (MEF), secondo procedure standard. Il terreno usato era terreno di Dulbecco modificato da Eagle ad alto contenuto di glucosio (Celbio) contenente 15% siero fetale bovino (Hyclone), 0.1 mM β -mercaptoetanolo (Sigma), 1 mM sodio piruvato (GIBCO), 1X amminoacidi non essenziali (GIBCO), 2 mM glutammina (GIBCO), 100U/ml penicillina/streptomicina (GIBCO) e 10³ U/ml fattore di inibizione della leucemia (LIF) (Chemicon). Per il differenziamento *in vitro* in cardiomiociti, le cellule ES erano coltivate in



corpi embrioidi, essenzialmente come descritto (Maltsev et al., 1993; Wobus et al. 1991). In breve, 400 cellule in 20 μ l di terreno di coltura senza LIF (Leukemia Inhibitor Factor, utilizzato per mantenere le cellule ES in uno stato indifferenziato) erano poste sui coperchi delle piastre di coltura riempiti con PBS e coltivati in gocce sospese per 2 giorni. Dopo altri 3 giorni di coltura in piastre di Petri per batteriologia (Figura 1) in terreno di coltura senza LIF, gli EB di 5 giorni erano piastrati separatamente su piastre a 48 pozzetti ricoperte di gelatina per un'analisi morfologica, e su piastre da 100 mm per RT-PCR e Western blot. La contrazione ritmica degli EB, che indica il differenziamento in muscolo cardiaco, è stata monitorata usando un microscopio a contrasto di fase (Leica).

Trasfezione delle cellule e purificazione della proteina

Cellule ES non differenziate (10^7 /ml) sono state sottoposte ad elettroporazione con DNA linearizzato (30 μ g) a 400 V, 250 μ F in 0.9 ml di PBS. Derivati del vettore pallino β A sono stati digeriti con Scal; le mutazioni nucleotidiche sono state introdotte per PCR per eliminare l'eccesso di siti Scal, quando necessario. Le cellule elettroporate erano poi piastrate su cellule STO (Smith and Hooper, 1983) resistenti alla puromicina in terreno di coltura. 24 ore dopo il piastramento, il terreno era sostituito con terreno fresco con 2 μ g/ml puromicina e cambiato ogni giorno. Al giorno 7 dopo l'elettroporazione, i cloni resistenti erano raccolti, espansi e sottoposti al saggio di differenziamento. La trasfezione di cellule 293EBNA era effettuata come già descritto (Minchiotti et al., 2000). L'efficienza era monitorata per cotrasfezione con un cDNA codificante Plgf (Maglione et al., 1991).

La proteina Cripto ricombinante secreta già denominata Cripto-His era ottenuta e purificata come già descritto (Minchiotti et al., 2001). In breve, la proteina era purificata da terreno condizionato di un clone di cellule 293 stabilmente trasfettato (ottenuto con il vettore pCDNA3 cripto-His (Minchiotti et al., 2001), usando il sistema di purificazione di proteine Qiaexpress (Quiagen). La proteina purificata era dializzata contro 50mM tampone sodio fosfato, pH 8. La proteina ricombinante Cripto-Fc era purificata da terreno condizionato di cellule 293T trasfettate con il vettore CriptoFc/plg, secondo le istruzioni del produttore (R&D).

Western blot e induzione di Smad2

Cellule ES indifferenziate (wt o Cripto^{-/-}) o EB derivate da linee cellulari ES wt (RI) o Cripto^{-/-} (DE7) a diversi stadi di differenziamento in vitro sono state lisate in un tampone con: 10mM Tris/Cl pH 8, 140mM NaCl, 2mM EDTA pH 8, 1% NP-40 e analizzate per western blot come già descritto (Minchiotti et al., 2000). Gli anticorpi monoclonali anti-HA (12CA5) (ROCHE) 31HL anti-Porina 31HL (Calbiochem, cat. #529538) erano usati secondo le istruzioni del rispettivo produttore.

EB Cripto^{-/-} di due giorni erano tenuti per 3 hr in terreno senza LIF in basso siero (1%), dopo che la proteina Cripto-His era aggiunta direttamente allo stesso terreno. Al tempo indicato, gli EB erano disciolti in tampone di lisi di Laemmli (Laemmli, 1970) e analizzati per Western blot usando il sistema Trans-Blot Semi-dry (BIO-RAD), secondo le istruzioni del produttore. Gli anticorpi policlonali di coniglio anti-Smad2/3, anti-fosfo-Smad2 (Ser465/467) (Upstate Biotechnology) e

anti-fosfo-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) erano usati secondo le istruzioni del produttore.

Preparazione del RNA e RT-PCR

RNA totale da cellule ES non differenziate o da EB a diversi stadi di differenziamento *in vitro* era estratto con il kit TRIzol (Life Technologies Inc.) secondo le istruzioni del produttore e trascritto inversamente in cDNA con la trascrittasi inversa SuperScript II (Life Technologies Inc.) e esameri random (come inneschi). Campioni di cDNA sintetizzati da 100ng di RNA totale erano sottoposti ad amplificazione con PCR con inneschi specifici. Gli inneschi e le condizioni della PCR erano le seguenti:

Nodal: F, 5'TTCCTTCTCAGGTCACGTTTGC3';

R, 5'GGTGGGGTTGGTATCGTTTCA3,

temperatura di ibridazione 58°C, cicli 35, frammento di 518 bp;

ALK-4: F, 5'AAGGATCCAGGCTCTGCTGTGTGCC3';

R, 5'ACGGATCCATGTCCAACCTCTGGCGG3',

temperatura di ibridazione 60°C, cicli 30, frammento di 411 bp;

ActRIIB: F, 5'ATGTGCCGTGGTGTCTGTGGT3'

R, 5'GACCTCCTGATCAGGGATAC,

temperatura di ibridazione 58°C, cicli 30, frammento di 541 bp;

MLC2v: F, 5'GCCAAGAAGCGGATAGAAGGCGGG3';

R, 5'CTGTGGTTCAGGGCTCAGTCCTTC3';

temperatura di ibridazione 70°C, cicli 33, frammento di 490 bp;

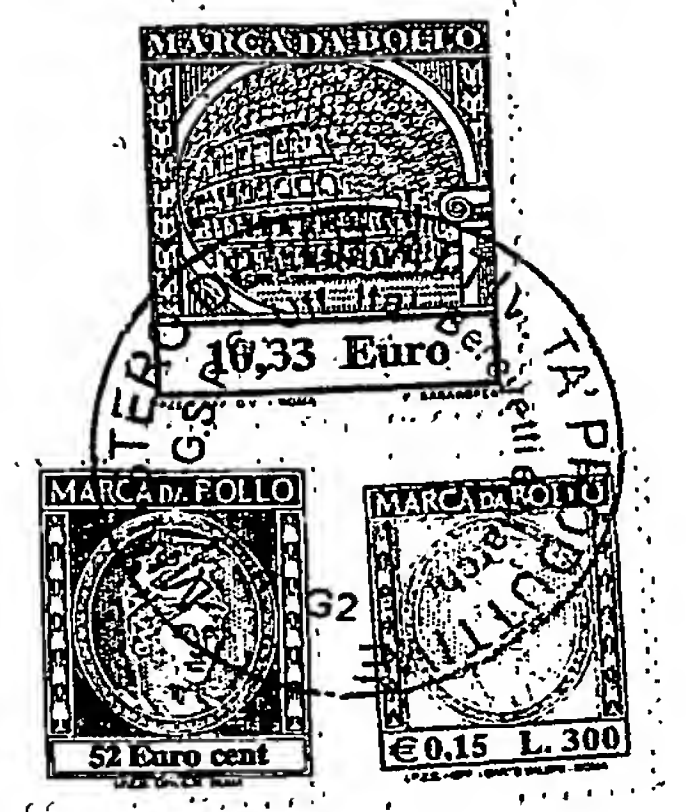
αMHC cardiaca : F, 5'GGAAGAGTGAGCGGCGCATCAAGG3'

R, 5'CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG3',

temperatura di ibridazione 65°C, cicli 30, frammento di 301 bp;

HPRT: F, 5'CCTGCTGGATTACATTAAAGCACTG3'
 R, 5'CCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGG3',

temperatura di ibridazione 58°C, cicli 25, frammento di 369 bp; utilizzato come controllo.



Derivati mutanti di Cripto

Tutti i mutanti di *cripto* (sia di delezione che di sostituzione) erano ottenuti con metodo basato su PCR con il cDNA completo di Cripto come già descritto (Minchiotti et al., 2001); in tutti i casi i frammenti amplificati erano sequenziati in entrambe le direzioni con il metodo dideossinucleotidico.

A. Mutanti per delezione

Il cDNA Cripto-His (sequenza dal nt -5 al nt +468 del cDNA cripto) era clonato nel vettore di espressione pCDNA3 (Invitrogen) o in pallino β A. Il cDNA Cripto-Fc (sequenza dal nt -5 al nt +468 del cDNA cripto) era prodotto usando il sistema di espressione plg-tail (N. MBK-006-5, R&D). Entrambi i cDNA sono stati già descritti (Minchiotti et al., Development, 2001, 4501-4510).

Il cDNA EGF-CFC (sequenza dal nt -5 al nt +75 fusa ai nt. 157-468), il cDNA EFG lungo (sequenza dal nt -5 al nt +288) e il cDNA EGF corto (sequenza dal nt -5 al nt +75 fusa ai nt 157-288) erano clonati in pallino β A.

B. Mutanti puntiformi

I derivati di cDNA cripto erano ottenuti con i seguenti oligonucleotidi:

1. Asn63-Ile

5'-GTAAGTCGCTTATTA AAAACTTGCTGTC-3'

5'-GACAGCAAGTTTTTAATAAGCGACTTAC-3'

2. Gly71-Asn

5'-CTTGCTGTCTGAATGGAAACACTTGCATCCTGGGGTCC-3'

5'-GGACCCCAGGATGCAAGTGTTTCCATTCAGACAGCAAG-3'

3. Thr72-Ala

5'-GAATGGAGGGGCTTGCATCCTGG-3'

5'-CCAGGATGCAAGCCCCTCCATTC-3'

4. Ser77-Ala

5'-CTTGCATCCTGGGGGCCTTCTGTGCCTGC-3'

5'-GCAGGCACAGAAGGCCCCCAGGATGCAAG-3'

5. Phe78-Ala

5'-GCATCCTGGGGTCCGCCTGTGCCTGCCCTCC-3'

5'-GCATCCTGGGGTCCGCCTGTGCCTGCCCTCC-3'

6. Phe78-Trp

5'-GCATCCTGGGGTCCTGGTGTGCCTGCCCTCC-3'

5'-GGAGGGCAGGCACACCAGGACCCCAGGATGC-3'

7. His104-Ala

5'-GTGGGTCTATCCTCGCTGGCACCTGGCTGCCC-3'

5'-GGGCAGCCAGGTGCCAGCGAGGATAGACCCAC-3'

8. Trp107-Gly

5'-CATGGCACCGGGCTGCCCAAG-3'

5'-CTTGGGCAGCCCGGTGCCATG-3'

9. Arg116-Ala

5'-GTGTTCCCTGTGCGCATGCTGGCACGGCCAG-3'

5'-CTGGCCGTGCCAGCATGCGCACAGGGAACAC-3'

10. Leu122-Asn

5'-GCTGGCACGGCCAGAACCACTGTCTTCCTCAG-3'

5'-CTGAGGAAGACAGTGGTTCTGGCCGTGCCAGC-3'

I cDNA Alk4 WT e attivato (CA), Taram-A WT e attivato (CA), smad2 attivato (smad2CA) e Ras attivato (RasCA) erano subclonati in pallino β A per espressione in cellule ES. Quando necessario, i siti di restrizione erano trattati con polimerasi di Klenow.

Le sequenze delle proteine ottenute sono indicate di seguito:

mCripto

MGYFSSSVLLVAISSAFEFGPVAGRDLAIRDNSIWDQKEPAVRDRSFQFVPS
VGIQNSKSLNKTCCLNNGGTCILGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEHCGSILHGT
WLPKKCSLCRCWHGQLHCLPQTFLPGCDGHVMDQDLKASRTPCQTPSVTTTFM
LAGACLFDMKV

Nucleotidi -5 a +516 (Dono et al., 1993)

Amminoacidi 1-171 (Dono et al., 1993)

Secreted (mCripto)

MGYFSSSVLLVAISSAFEFGPVAGRDLAIRDNSIWDQKEPAVRDRSFQFVPS
VGIQNSKSLNKTCCLNNGGTCILGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEHCGSILHGT
WLPKKCSLCRCWHGQLHCLPQTFLPGCDGHVMDQDLKASRTPCQTPSVTT

Nucleotidi -5 a +468 della sequenza di Cripto (Dono et al., 1993)

Amminoacidi 1-156 della sequenza di Cripto (Dono et al., 1993)

Secreted His-tagged (mCripto His)

MGYFSSSVLLVAISSAFEFGPVAGRDLAIRDNSIWDQKEPAVRDRSFQFVPS
VGIQNSKSLNKTCCLNNGGTCILGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEHCGSILHGT
WLPKKCSLCRCWHGQLHCLPQTFLPGCDGHVMDQDLKASRTPCQTPSVTTTNS

GHHHHHH

Nucleotidi -5 a +468 della sequenza di Cripto (Dono et al., 1993)

Amminoacidi 1-156 della sequenza di Cripto (Dono et al., 1993)

Amminoacidi 157-166 His-tag

EGF-CFC (mCripto)

MGYFSSSVLLVAISSAFEFGPVAGSVGIQNSKSLNKTCCCLNGGTCILGSFCA
 CPPSFYGRNCEHDVRKEHCGSILHGTWLPKKCSLCRCWHGQLHCLPQTFLPGC
 DGHVMDQDLKASRTPCQTPSVTT

Nucleotidi -5 a +75 fusi a +157 a +468 della sequenza di mouse Cripto
 (Dono et al., 1993)

Amminoacidi 1-25 fusi a 53-156

EGF-CFC His-tagged (mCripto)

MGYFSSSVLLVAISSAFEFGPVAGSVGIQNSKSLNKTCCCLNGGTCILGSFCA
 CPPSFYGRNCEHDVRKEHCGSILHGTWLPKKCSLCRCWHGQLHCLPQTFLPGC
 DGHVMDQDLKASRTPCQTPSVTTTNSGHHHHHH

Nucleotidi -5 a +75 fusi a +157 a +468 della sequenza di mouse Cripto
 (Dono et al., 1993)

Amminoacidi 1-25 fusi a 53-156

Amminoacidi 157-166 His-tag

EGF short (mCripto)

MGYFSSSVLLVAISSAFEFGPVAGSVGIQNSKSLNKTCCCLNGGTCILGSFCA
 CPPSFYGRNCEHDVRK

Nucleotidi -5 a +75 fusa a +157 a +288 (Dono et al., 1993)

Amminoacidi 1-25 fusi a 53-96

EGF long (mCripto)

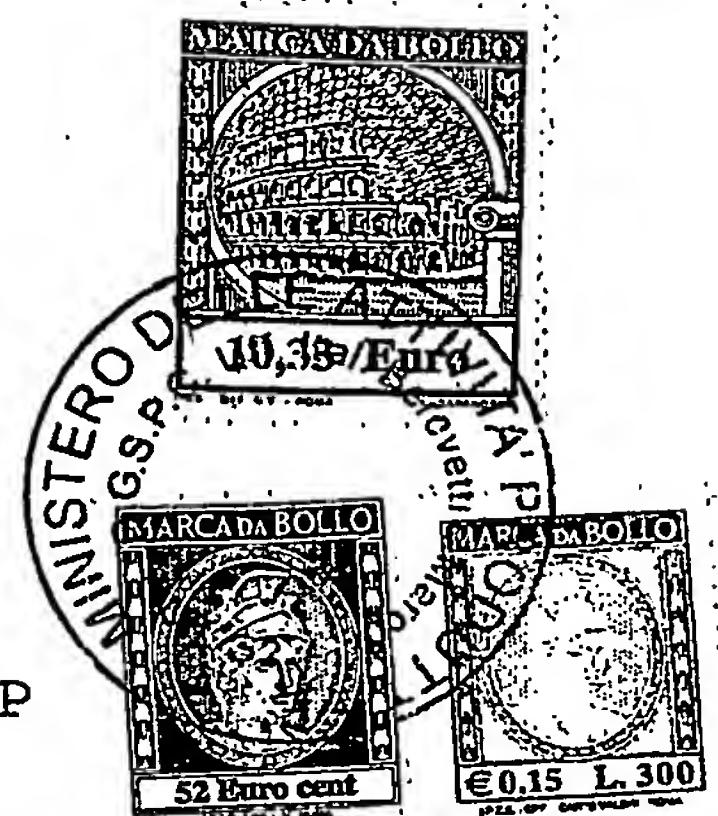
MGYFSSSVLLVAISSAFEFGPVAGRDLAIRDNSIWDQKEPAVRDRSFQFVPS
 VGIQNSKSLNKTCCCLNGGTCILGSFCACPPSFYGRNCEHDVRK

Nucleotidi -5 a +288 della sequenza mouse Cripto (Dono et al., 1993)

Amminoacidi 1-96 (Dono et al., 1993)

hCripto

MDCRKMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWP
QEEP AIRPRSSQ RVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNC
EHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLV
ASRTPELPPSARTTTTFMLVGACLFDMKV



Nucleotidi 244 a 814 della sequenza di Cripto umana (Ciccodicola et al. 1989).

Amminoacidi 1-188 (Dono et al., 1993)

hCripto secreta

MDCRKMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWP
QEEP AIRPRSSQ RVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNC
EHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLV
ASRTPELPPSARTT

Nucleotidi 244 a 766 della sequenza di Cripto umana (Ciccodicola et al., 1989).

Amminoacidi 1-173 (Dono et al., 1993)

hCripto secreta his-tagged

MDCRKMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWP
QEEP AIRPRSSQ RVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNC
EHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLV
ASRTPELPPSARTTTNSGHHHHHH

Nucleotidi 244 a 766 della sequenza di Cripto umana

Amminoacidi 1-173 (Dono et al., 1993)

Amminoacidi 174-183

His tag

Risultati

Cripto secreta mantiene la sua capacità di attivare il differenziamento in cardiomiociti.

Dati precedenti su cellule staminali embrionali in coltura mancanti di *Cripto* hanno rivelato un ruolo essenziale per la formazione di cardiomiociti contrattili. Cellule ES *Cripto*^{-/-} perdono selettivamente la capacità di formare cardiomiociti, procedimento che può essere riattivato per espressione di *cripto* (Xu et al., 1998). Tuttavia risulta altamente vantaggioso indagare se la sua forma secreta possa riattivare il differenziamento in cardiomiociti di cellule ES *Cripto*^{-/-}. Per questo scopo è stato overespresso un derivativo di cripto secreto, mancante della regione idrofobica al -C terminale per l'ancoraggio alla membrana (Minchiotti et al., 2000), in cellule ES *Cripto*^{-/-} e la sua attività è stata paragonata a quella di *Cripto* wt. Una popolazione cellulare selezionata per la resistenza alla puromicina è stata esaminata per il numero di EB contenenti aree contrattili, dal giorno 8 al giorno 12 di differenziamento in vitro (Figure 1 e 2A). Sono stati osservati cardiomiociti contrattili ritmicamente spontaneamente in cellule ES *Cripto*^{-/-} che esprimevano la proteina ancorata alla membrana o secreta (Figura 2B). Risultati simili sono stati ottenuti esprimendo una proteina *Cripto* secreta mancante della regione N-Terminale (EGF-CFC; Figure 2A e 2B) indicando che non solo l'ancoraggio di membrana è indispensabile per l'attività ma che il dominio EGF-CFC da solo è sufficiente per l'attività *Cripto* per l'induzione cardiogenica. E' stato

pertanto definito se il dominio di Cripto simile al EGF sia in grado da solo di indurre una cardiogenesi simile al peptide EGF-CFC. Due derivati per delezione del cDNA di Cripto codificanti nel dominio simile all'EGF insieme alla regione N terminale (EGF lungo) o solo il dominio EGF (EGF corto, Figura 2B) sono stati generati. Non si osservava alcuna area di cellule contrattili in CE derivati da cellule ES Cripto^{-/-} esprimenti il peptide EGF lungo o EGF corto (Figura 2B), indicando che almeno il dominio CFC di Cripto è essenziale per l'induzione cardiogenica. Un'analisi per Western blot ha mostrato che il peptide EGF lungo era prodotto e secreto come EGF-CFC (Figura 2C), dimostrando così che la sua incapacità a riattivare il fenotipo mutante non è dovuta ad una differenza del livello di espressione della proteina. Risultati simili sono stati ottenuti con il costrutto EGF corto. Per spiegare i dati morfologici osservati, è stata esaminata l'espressione della catena pesante della miosina specifica per il cuore (α MHC) e della catena leggera 2v della miosina (MLC2v), le due principali proteine contrattili dei cardiomiociti. Come atteso, l'espressione dei geni α MHC e MLC2v era indotta in cellule ES wt ma non in cellule Cripto^{-/-} dal giorno 7 di differenziamento in vitro (Figura 2D). Il pattern di espressione dei geni α MHC e MLC2v in cellule ES wt è stato riprodotto in cellule Cripto^{-/-} esprimenti sia cripto wt che il suo derivato secreto, ma non in cellule esprimenti il peptide EGF lungo o EGF corto (Figura 2E).

Comparsa e durata dell'attività Cripto nel differenziamento dei cardiomiociti

La comparsa dell'espressione di Cripto durante il differenziamento delle cellule ES è stata analizzata. Un'analisi Western blot con anticorpi anti-Cripto su lisati da cellule ES sia wt che Cripto^{-/-}, ha rivelato che Cripto è evidenziabile sin dal giorno 0 e ha un picco al giorno 4 in in CE wt (Figura 3). L'accumulo temporaneo di Cripto suggerisce che la sua attività possa essere richiesta ad un punto definito del differenziamento dei cardiomiociti. Saggi di trasfezione non sono adatti per indagare sul tempo di attività di Cripto. Pertanto una proteina Cripto ricombinante solubile, in cui il C-terminale idrofobico è sostituito con un epitopo 6xHis, è stato usato (Cripto-His; Minchiotti et al., 2001). In base all'osservazione che la proteina Cripto è in grado di promuovere la cardiogenesi quando espresso in cellule ES Cripto^{-/-} (Figura 2B), sono stati ideati esperimenti in cui il segnale Cripto è stato ricostituito per aggiunta di una proteina Cripto ricombinante secreta direttamente alle cellule (Figura 4). L'aggiunta di Cripto durante l'intervallo dei giorni 0-2 restaura efficacemente la capacità di differenziamento delle cellule ES Cripto^{-/-}. L'aggiunta a tempi seguenti provoca una riduzione drammatica del differenziamento dei cardiomiociti (Figura 4A). Risultati comparabili sono stati ottenuti con due cloni ES Cripto^{-/-} (DE7 e DE14; Xu et al., 1998), escludendo pertanto qualsiasi differenza di fenotipo dovuta a variazione clonale (Figura 4A). Questi dati indicano che lo stimolo *in trans* con la proteina Cripto solubile era pienamente efficiente per la promozione dell'induzione e del differenziamento dei cardiomiociti e, in maniera più rilevante, definisce esattamente quando l'attività di Cripto è richiesta per promuovere la determinazione verso la linea cardiaca. Inoltre, per definire la concentrazione ottimale di Cripto richiesta per

promuovere la cardiogenesi, sono state aggiunte quantità crescenti di proteina Cripto ricombinante purificata direttamente al terreno di coltura di EB Cripto^{-/-} di due giorni dalle linee cellulare DE7 o DE14, per 24 ore (Figura 4B). Quantità crescenti di Cripto ricombinante provocano un aumento dell'efficienza di differenziamento (Figura 4B), indicando pertanto che l'induzione cardiogenica mediata da Cripto è dose-dipendente.

E' stato poi indagato se la durata della dose di Cripto è cruciale per la sua risposta biologica. EB di 2 giorni da cellule ES Cripto^{-/-} DE7 o DE14, sono stati trattati con 10 µg/ml di Cripto ricombinante per diversi periodi, lavate per rimuovere il Cripto non legato e poi coltivate per i restanti giorni. Una risposta di Cripto efficace richiede una induzione minima di 24 ore, mentre induzioni più brevi mostrano un'attività ridotta (Figura 4C). In conclusione la quantità, il tempo e la durata del segnale di Cripto sono fattori cruciali per ottenere l'induzione e il differenziamento cardiogenico.

Cripto attiva Smad2 associato con il differenziamento dei cardiomiociti.

I risultati ottenuti nel topo, in *Xenopus* e *Zebrafish* indicano un forte collegamento funzionale tra le proteine EGF-CFC e il ligando per il TGF β (Adamson et al., 2002; Shen and Schier, 2000). In accordo studi recenti hanno dimostrato che Cripto può associarsi con il recettore ActRIB di tipo 1 (Alk4) e può formare un complesso con Nodal e con il recettore ActRIIB di tipo 2 (Reissman et al., 2001; Yeo and Whitman, 2001, Bianco et al., 2002; Yan et al., 2002). L'attivazione della proteina Smad per fosforilazione è un segnale universale dell'evento di trasduzione a seguito dell'attivazione dei recettori Alk. Per indagare se



Cripto attivi Smad2 durante l'induzione e il differenziamento dei cardiomiociti, EB Cripto^{-/-} di 2 giorni sono mantenuti in basso siero per 3 ore e poi stimolati con proteina Cripto solubile ricombinante per 30, 60 o 120 minuti. Un'analisi Western blot ha rivelato che la fosforilazione di Smad2 aumenta in maniera significativa seguendo il trattamento con Cripto ricombinante. La fosforilazione di Smad2 era evidenziabile già dopo 30 minuti, persistendo a livelli comparabili anche dopo esposizione prolungata alla proteina Cripto. Per normalizzare la quantità totale di proteina è stato applicato un anticorpo anti-Smad 2-3 allo stesso blot (Figura 5). Studi *in vitro* su linee cellulari di mammifero hanno suggerito che Cripto è coinvolto nel metabolismo Ras/Raf/MEK/MAPK (Salomon et al., 1999). Se si indaga sull'attivazione della kinasi MAP (ERK) usando un anticorpo anti-fosfo ERK si prova che Cripto ricombinante non è in grado di attivarla, indicando che Smad2 è attivata selettivamente durante l'induzione e il differenziamento dei cardiomiociti indotti da Cripto.

Non ci sono dati disponibili sul profilo di espressione di tutti i componenti del complesso Alk4/ActRIIB/Nodal durante il differenziamento di cellule ES; pertanto è stata controllata per RT-PCR l'espressione di Nodal, Alk4 e ActRIIB in EBs derivati da cellule ES wt o Cripto^{-/-} ES. Nodal, Alk4 e ActRIIB erano espressi in tutti gli stadi analizzati (Figura 6A). Se il segnale di Cripto nel differenziamento dei cardiomiociti agisse attraverso il recettore Alk4, ci si dovrebbe aspettare che la superespressione di un recettore di tipo I, attivo in maniera costitutiva, compensi la mancanza del segnale di Cripto per la promozione del differenziamento dei cardiomiociti. A questo scopo sono

stati superespressi in cellule ES Cripto^{-/-}, la forma wt o quella attivata ca sia di Alk4 Ha-tagged umano che del suo analogo in *Zebrafish*, Taram-A (Renucci et al., 1996). Le chinasi per serina/treonina del recettore di tipo I possono essere attivate in una maniera indipendente dal ligando e dal recettore di tipo II sostituendo un residuo acidico con una treonina specifica all'interno della regione prossima alla membrana del dominio intracellulare, nota per essere coinvolta nella regolazione della chinasi (Wieser et al., 1995). La superespressione di Alk4 ca o di Taram-A ca restaura parzialmente la capacità di cellule ES Cripto^{-/-} a differenziare in cardiomiociti (Tabella 1). Al contrario, la superespressione dei recettori wt, sia TaramA che Alk4 non ha alcuna attività significativa nonostante livelli di espressione simili (Figura 6B). In accordo con i dati morfologici, l'espressione del gene α MHC era evidenziabile solo in cellule ES Cripto^{-/-} esprimenti la forma attivata dei recettori (Figura 6C).

Dati recenti in *Zebrafish* hanno dimostrato che l'attivazione intracellulare di Nodal, indotta per espressione in una forma attivata del recettore Taram-A, è sufficiente a indurre le cellule verso la linea endodermica (David and Rosa, 2001). Per escludere la possibilità che Alk4 attivato possa interferire con il differenziamento in cardiomiociti, Cripto ricombinante è stato aggiunto a cellule che esprimevano Alk4 ca. Il trattamento con Cripto reinstaura pienamente il differenziamento, indicando che il recettore attivato non ha alcun effetto negativo sul differenziamento in cardiomiociti (Tabella 2).

L'analisi dei mutanti Cripto identifica residui cruciali sia nel dominio di EGF che di CFC

E' stato mostrato che il dominio EGF-CFC è sufficiente a promuovere l'induzione cardiogenica quando superespresso in cellule ES Cripto^{-/-}, mentre il dominio EGF da solo non ha tale attività. Per determinare il contributo dei domini EGF e CFC, sono state introdotte nel cDNA per Cripto delle sostituzioni per generare mutazioni per aminoacidi singoli (Figura 7A); l'attività delle proteine mutanti corrispondenti è stata paragonata al wt nel saggio cardiomiocitico. Sebbene ciascun mutante fosse espresso a livelli comparabili al Cripto wt (Figura 7B), tre di essi erano completamente inattivi o mostravano un'attività fortemente ridotta (Tabella 3). Risultati simili sono stati ottenuti con due cloni ES Cripto^{-/-} indipendenti (Tabella 3). Per supportare i dati morfologici, è stata esaminata l'espressione dei geni α MHC e MLC2v per RT-PCR sul RNA totale preparato da EB derivati da cellule ES Cripto^{-/-} che superesprimevano i mutanti di Cripto (Figura 7C). L'espressione dei geni α MHC e MLC2v era assente o ridotta nelle cellule che superesprimevano i mutanti cripto G71N, F78A o W107G, mentre era presente in cellule Cripto^{-/-} trasfettate con Cripto wt. Pertanto i residui amminoacidici critici sono localizzati nei domini EGF e CFC, indicando il requisito di entrambi per l'attività di Cripto nell'induzione cardiogenica.

Lavori recenti hanno mostrato che la proteina Cripto è modificata per aggiunta di residui glicidici. Una glicosilazione N-linked interferisce con l'attività biologica di Cripto nel saggio *Zebrafish* (Minchiotti et al., 2001). Più recentemente è stato riportato che una fucosilazione O-linked è richiesta per l'attività di Cripto in saggi di costrasfezione in cellule di mammifero (Schiffer et al., 2001; Yan et al., 2002). Per determinare se le modifiche post-traduzionali siano richieste per l'attività di Cripto

nell'induzione cardiogenica, sono state generate due sostituzioni di Alanina, corrispondenti ai siti di N-glicosilazione N631 e di O-fucosilazione T72A. Le attività delle proteine mutanti corrispondenti sono state saggiate in saggi di differenziamento e paragonate a Cripto wt. In base alla percentuale di EB contenente aree contrattili, entrambe le proteine mutanti hanno una capacità paragonabile nel promuovere il differenziamento dei cardiomiciti a quella di Cripto wt (Tabella 3), indicando che l'aggiunta di residui glicidici non è richiesta per l'attività di Cripto in cellule ES.

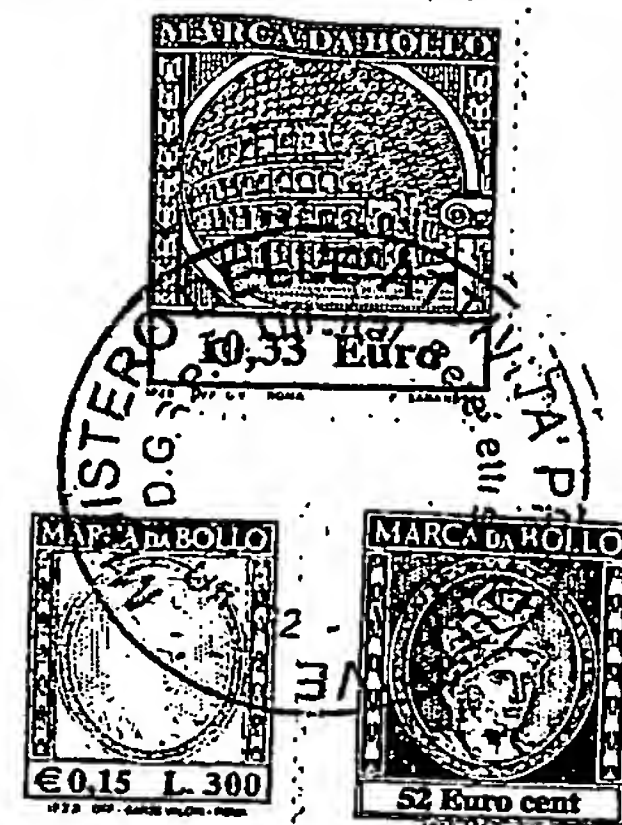


Tabella 1. % di EB contrattili da cellule ES Cripto^{-/-} trasfettate con i recettori wt o ca di Alk4 umano o di Taram-A di *Zebrafish*

Cellule	Costrutto	EB analizzati	% EB contrattili
DE7	none	70	0
DE7	Cripto wt	50	96.6
DE7	Alk4 wt	76	0
DE7	Alk4 ca	50	16.0
DE7	Taram-A wt	55	0
DE7	Taram-A ca	64	45.0
DE7	empty vector	56	0
DE14	None	80	0
DE14	Cripto wt	54	94.4
DE14	Taram-A wt	50	1.9
DE14	Taram-A ca	51	62.2
DE14	empty vector	60	0

I dati sono rappresentativi di almeno due esperimenti indipendenti.

DE7 e DE14 sono due cloni indipendenti di Cripto^{-/-} (si veda Mat. e Met.).

Tabella 2. % di EB contrattili da cellule Cripto^{-/-} trasfettate.

Costrutto	Proteina	EB analizzati	% EB contrattili
Alk4 ca	none	50	16.0
Alk4 ca	Cripto ⁺	87	87.3
empty vector	none	49	0
empty vector	Cripto ⁺	60	96.6

EB di due giorni sono stati trattati con 10 μ g/ml di Cripto ricombinante per 3 giorni.

Tabella 3. % di EB contrattili da cellule ES Cripto^{-/-} trasfettate con Cripto wt o con suoi mutanti.

Cellule	Costrutto	EB analizzati	% EB contrattili
DE7	none	97	0
DE7	Cripto wt	56	98.2
DE7	N63I	54	91.5
DE7	G71N	54	0
DE7	T72A	62	90.3
DE7	S77A	60	95.0
DE7	F78A	47	42.5
DE7	F78W	60	95.0
DE7	H104A	56	89.3
DE7	W107G	57	7.6
DE7	R116G	49	80.0
DE7	L122N	103	92.0
DE7	empty vector	65	0
DE14	none	85	0
DE14	Cripto wt	54	94.4
DE14	G71N	49	0
DE14	F78A	45	66.0
DE14	W107G	57	30.5
DE14	empty vector	71	0

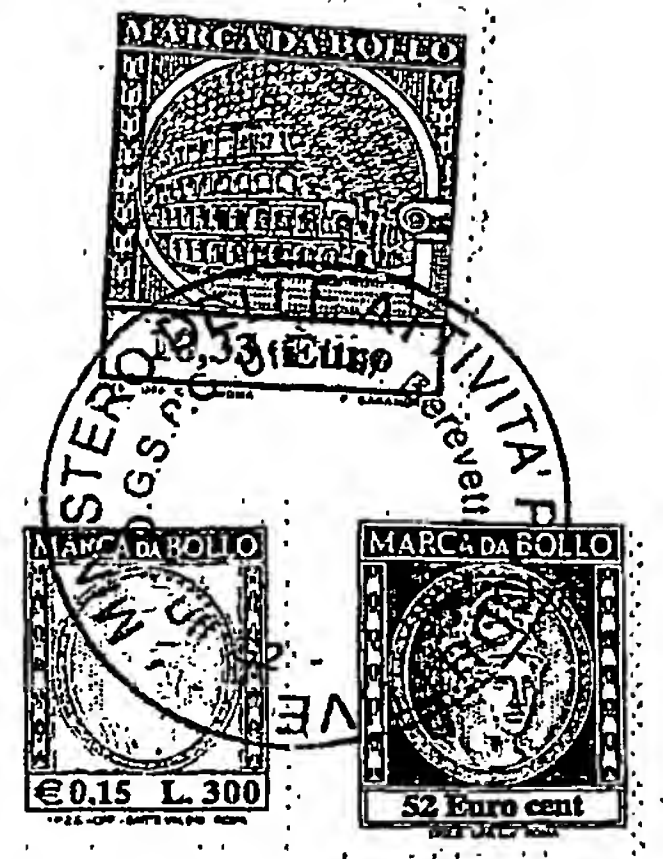
I dati sono rappresentativi di almeno due esperimenti indipendenti.
DE7 e DE14 sono due cloni indipendenti di Cripto^{-/-} (si veda Mat. e Met.).

Bibliografia

- Adamson, E.D., Minchiotti, G., and Salomon, D.S. (2002). Cripto: a tumor growth factor and more. *J. Cell. Physiol.* 190, 267-278.
- Bianco, C., Adkins, H.B., Wechselberger, C., Seno, M., Normanno, N., De Luca, A., Sun, Y., Khan, N., Kenney, N., Ebert, A., Williams, K.P., Sanicola, M., and Salomon, D.S. (2002). Cripto-1 activates nodal- and ALK4-dependent and -independent signaling pathways in mammary epithelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2586-2597.
- Bianco, C., Kannan, S., De Santis, M., Seno, M., Tang, C.K., Martinez-Lacaci, I., Kim, N., and Wallace-Jones, B., M.E., Ebert, A.D., Wechselberger, C., and Salomon D.S. (1999). Cripto-1 indirectly stimulates the tyrosine phosphorylation of erb B-4 through a novel receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 8624-8629.
- Boheler, K.R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H.T., Anisimov, S.V., and Wobus, A.M. (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ. Res.* 91, 189-201.
- Chang, H., Huylebroeck, D., Verschueren, K., Guo, Q., Matzuk, M.M., and Zwijsen, A. (1999) Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development* 126, 1631-1642.
- Cheng, S.K., Olale, F., Bennett, J.T., Brivanlou, A.H., and Schier, A.F. (2003). EGF-CFC proteins are essential coreceptors for the TGF-beta signals Vg1 and GDF1. *Genes Dev.* 17, 31-36.
- Ciccodicola, A., Dono, R., Obici, S., Simeone, A., Zollo, M. and Persico, M.G. (1989). Molecular characterization of a gene of the

- 'EGF family' expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. *EMBO J.* 8: 1987-1991
- David, N.B., and Rosa, F.M. (2001). Cell autonomous commitment to an endodermal fate and behaviour by activation of Nodal signalling. *Development* 128, 3937-3947.
 - Ding, J., Yang, L., Yan, Y.T., Chen, A., Desai, N., Wynshaw-Boris, A., and Shen, M.M. (1998). Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature* 395, 702-707.
 - Doetschman, T., Shull, M., Kier, A., and Coffin J.D. (1993). Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension* 22, 618-629.
 - Dono, R., Scalera, L., Pacifico, F., Acampora, D., Persico, M.G., and Simeone A. (1993). The murine cripto gene: expression during mesoderm induction and early heart morphogenesis. *Development* 118, 1157-1168.
 - Fishman, M.C., and Chien, K.R. (1997). Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* 124, 2099-2117.
 - Galvin, K.M., Donovan, M.J., Lynch, C.A., Meyer, R.I., Paul, R.J., Lorenz, J.N., Fairchild-Huntress, V., Dixon, K.L., Dunmore, J.H., Gimbrone, M.A.Jr., Falb, D., and Huszar, D. (2000). A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat. Genet.* 24, 171-174.
 - Gepstein, L. (2002). Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ. Res.* 91, 866-876.

- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W.S., and Schier, A.F. (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97, 121-132.
- Keller, G.M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7, 862-869.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lohmeyer, M., Harrison, P.M., Kannan, S., DeSantis, M., O'Reilly, N.J., Sternberg, M.J., Salomon, D.S., and Gullick, W.J. (1997). Chemical synthesis, structural modeling, and biological activity of the epidermal growth factor-like domain of human cripto. *Biochemistry* 36, 3837-3845.
- Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M.G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9267-9271.
- Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Hescheler, J., and Wobus, A.M. (1993). Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mechanism of Development* 44, 41-50.
- Marvin, M.J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S.M., and Lassar, A.B. (2001). Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* 15, 316-327.
- McFadden, D.G., and Olson, E.N. (2002). Heart development: learning from mistakes. *Current Opinon in Genetics and Development* 12, 328-335.



- Minchiotti, G., Manco, G., Parisi, S., Lago, C.T., Rosa, F., and Persico, M.G. (2001). Structure-function analysis of the EGF-CFC family member Cripto identifies residues essential for nodal signalling. *Development* 128, 4501-4510.
- Minchiotti, G., Parisi, S., Liguori, G., Signore, M., Lania, G., Adamson, E.D., Lago, C.T., and Persico, M.G. (2000). Membrane-anchorage of Cripto protein by glycosylphosphatidylinositol and its distribution during early mouse development. *Mech. Dev.* 90, 133-142.
- Monzen, K., Hiroi, Y., Kudoh, S., Akazawa, H., Oka, T., Takimoto, E., Hayashi, D., Hosoda, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Ishii, S., Yazaki, Y., Nagai, R., and Komuro, I. (2001). Smads, TAK1, and their common target ATF-2 play a critical role in cardiomyocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 153, 687-698.
- Monzen, K., Nagai, R., and Komuro, I. (2002). A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 263.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Sep 15;90(18):8424-8.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.
- Olson, E.N., and Srivastava, D. (1996). Molecular pathways controlling heart development. *Science* 272, 671-676.

- Reissmann, E., Jornvall, H., Blokzijl, A., Andersson, O., Chang, C., Minchiotti, G., Persico, M.G., Ibanez, C.F., and Brivanlou, A.H. (2001). The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes Dev.* 15, 2010-2022.
- Reiter, J.F., Verkade, H., and Stainier, D.Y. (2001). Bmp2b and Oep promote early myocardial differentiation through their regulation of gata5. *Dev. Biol.* 234, 330-338.
- Renucci, A., Lemarchandel, V., and Rosa, F. (1996). An activated form of type I serine/threonine kinase receptor TARAM-A reveals a specific signalling pathway involved in fish head organiser formation. *Development* 122, 3735-3743.
- Rosa, F.M. (2002). Cripto, a multifunctional partner in signaling: molecular forms and activities. *Sci. STKE* 2002, PE47
- Rosenthal, N., and Xavier-Neto, J. (2000). From the bottom of the heart: anteroposterior decisions in cardiac muscle differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 742-746.
- Salomon, D.S., Bianco, C., and De Santis, M. (1999). Cripto: a novel epidermal growth factor (EGF)-related peptide in mammary gland development and neoplasia. *Bioessays* 21, 61-70.
- Schiffer, S.G., Foley, S., Kaffashan, A, Hronowski, X., Zichittella, A.E., Yeo, C.Y., Miatkowski, K., Adkins, H.B., Damon, B., Whitman, M., Salomon, D., Sanicola, M., and Williams, K.P. (2001). Fucosylation of Cripto is required for its ability to facilitate nodal signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 37769-37778.

- Schultheiss, T.M., Burch, J.B., and Lassar, A.B. (1997). A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* 11, 451-462.
- Shen, M.M., and Schier, A.F. (2000). The EGF-CFC gene family in vertebrate development. *Trends Genet.* 16, 303-309.
- Smith T.A. and Hooper M.C. (1983). Medium conditioned by feeder cells inhibits the differentiation of embryonal carcinoma culture. *Exp Cell Res* 145: 458-62.
- Tzahor, E., and Lassar, A.B. (2001). Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes Dev.* 15, 255-260.
- Wieser, R., Wrana, J.L., and Massague, J. (1995). GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J.* 14, 2199-2208.
- Wobus, A.M., Wallukat, G., and Hesheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca^{2+} channel blockers. *Differentiation* 48, 173-182.
- Xu, C., Liguori, G., Adamson, E.D., and Persico, M.G. (1998). Specific arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1. *Dev. Biol.* 196, 237-247.
- Xu, C., Liguori, G., Persico, M.G., and Adamson, E.D. (1999). Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of

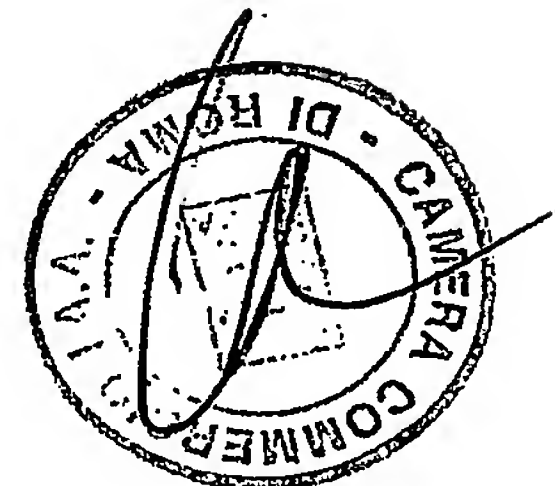
postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. Development 126, 483-494.

- Yan, Y.T., Liu, J.J., Luo, Y., E, C., Haltiwanger, R.S., Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2002). Dual roles of Cripto as a ligand and coreceptor in the nodal signaling pathway. Mol. Cell. Biol. 22, 4439-4449.
- Yeo, C., and Whitman, M. (2001). Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. Mol. Cell 7, 949-957.



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

Olga Capasso



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per indurre cellule staminali a differenziare in cardiomiociti che comprende l'esposizione per un tempo e in quantità efficaci di una proteina della famiglia EGF-CFC o suoi derivati aventi almeno i domini EGF e CFC.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui i domini derivano dalla sequenza della proteina Cripto.
3. Metodo secondo la rivendicazione 2 in cui i domini derivano dalla sequenza della proteina Cripto umana.
4. Metodo secondo la rivendicazione 2 in cui i domini derivano dalla sequenza della proteina Cripto di topo.
5. Composizione per uso terapeutico per il trattamento di deficienze cardiache, comprendente una quantità terapeuticamente efficace di una proteina o derivato di essa, avente almeno i domini EGF e CFC di una proteina della famiglia EGF-CFC.
6. Composizione secondo la rivendicazione 5 in cui la proteina ha almeno i domini EGF e CFC della proteina Cripto.
7. Composizione secondo la rivendicazione 6 in cui i domini derivano dalla sequenza della proteina Cripto umana.
8. Composizione secondo la rivendicazione 6 in cui i domini derivano dalla sequenza della proteina Cripto di topo.

Roma,

p.p.: Gabriella Minchiotti, Silvia Parisi, Maria Persico

DE SIMONE & PARTNERS S.p.A. (OC)

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

Olga Capasso

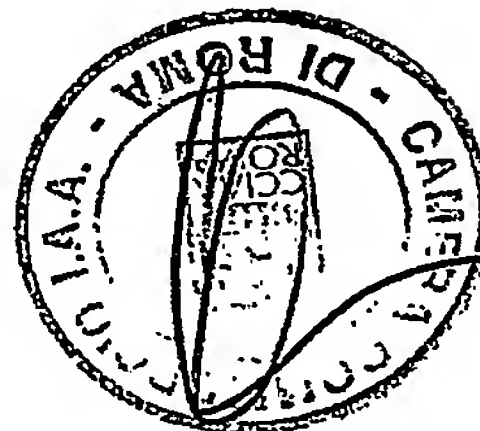
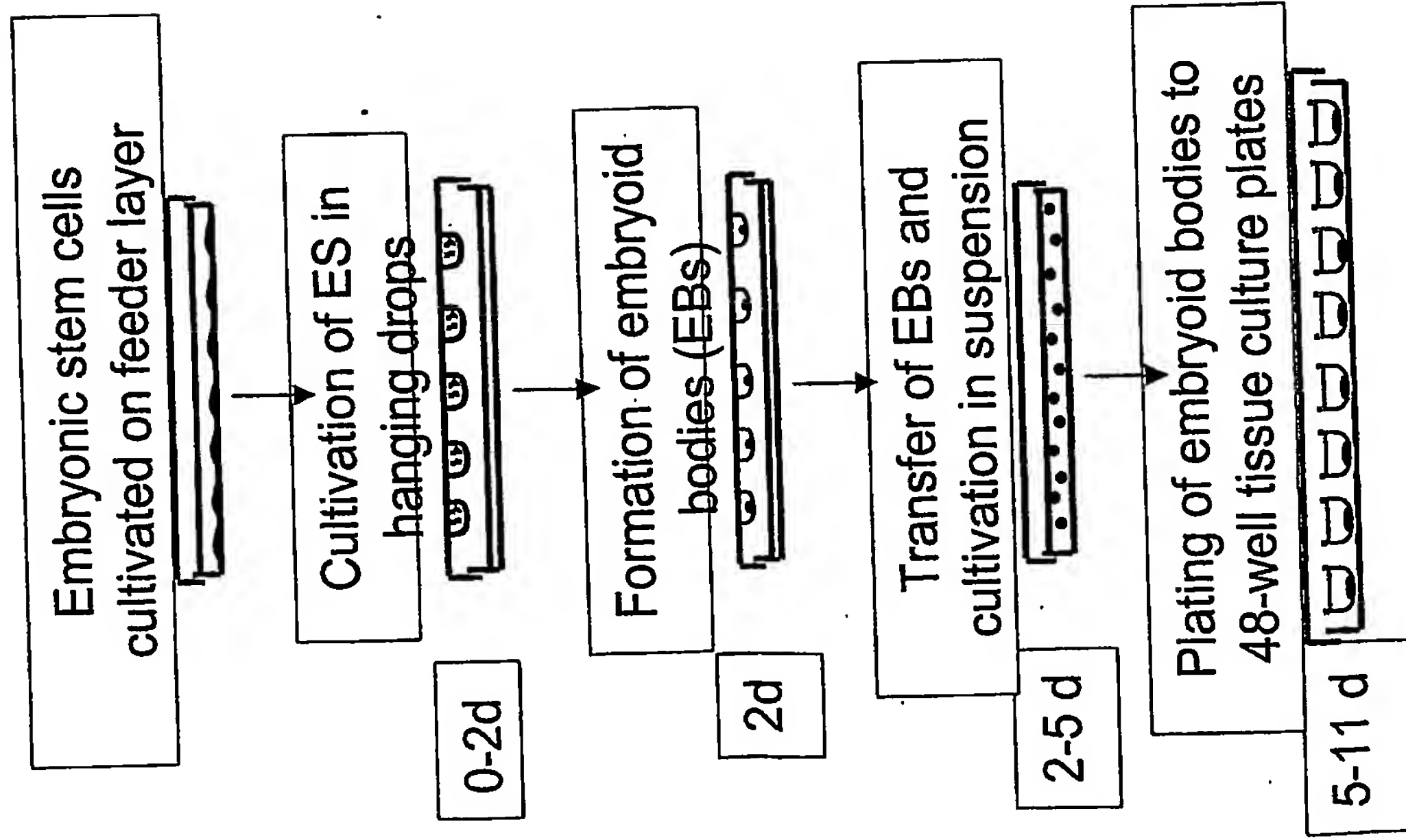
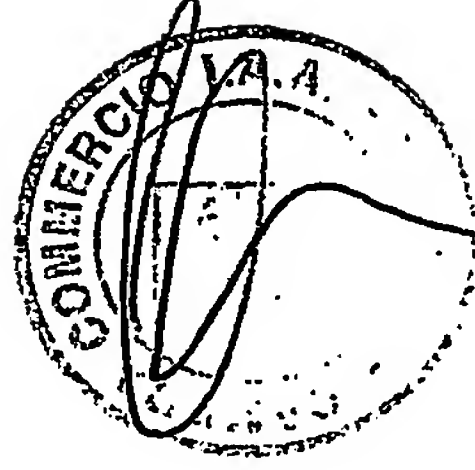


Fig. 1

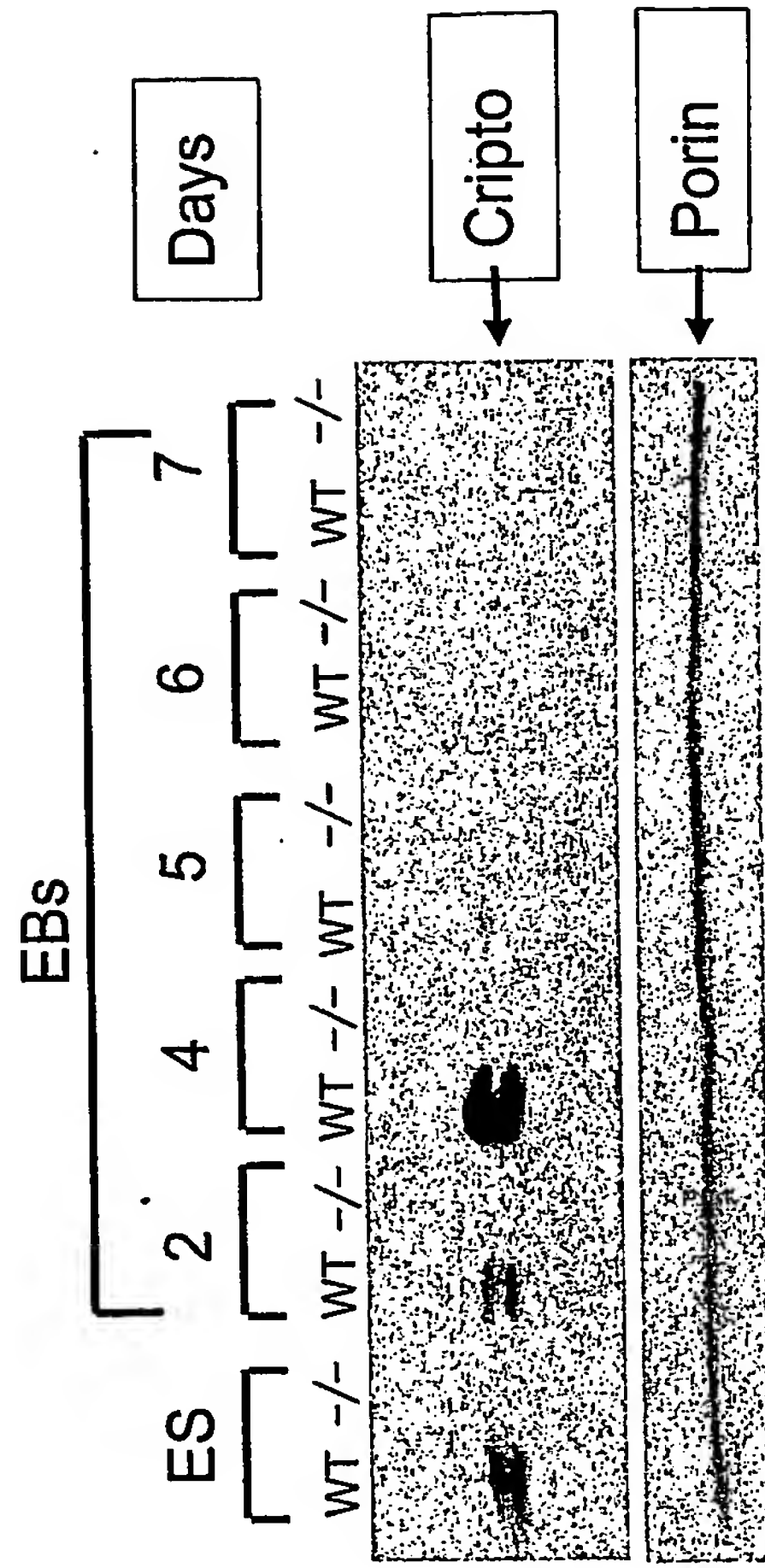


PM 2003 A 0001251

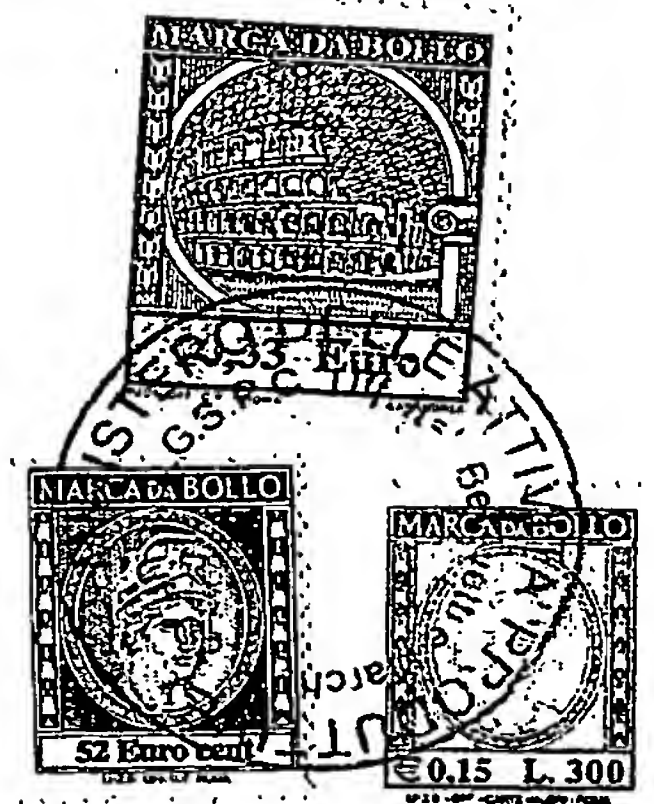


UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)
Olga Capasso

Fig. 3



RM 2003 A 000125



[Handwritten signature]

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)

Olga Capasso

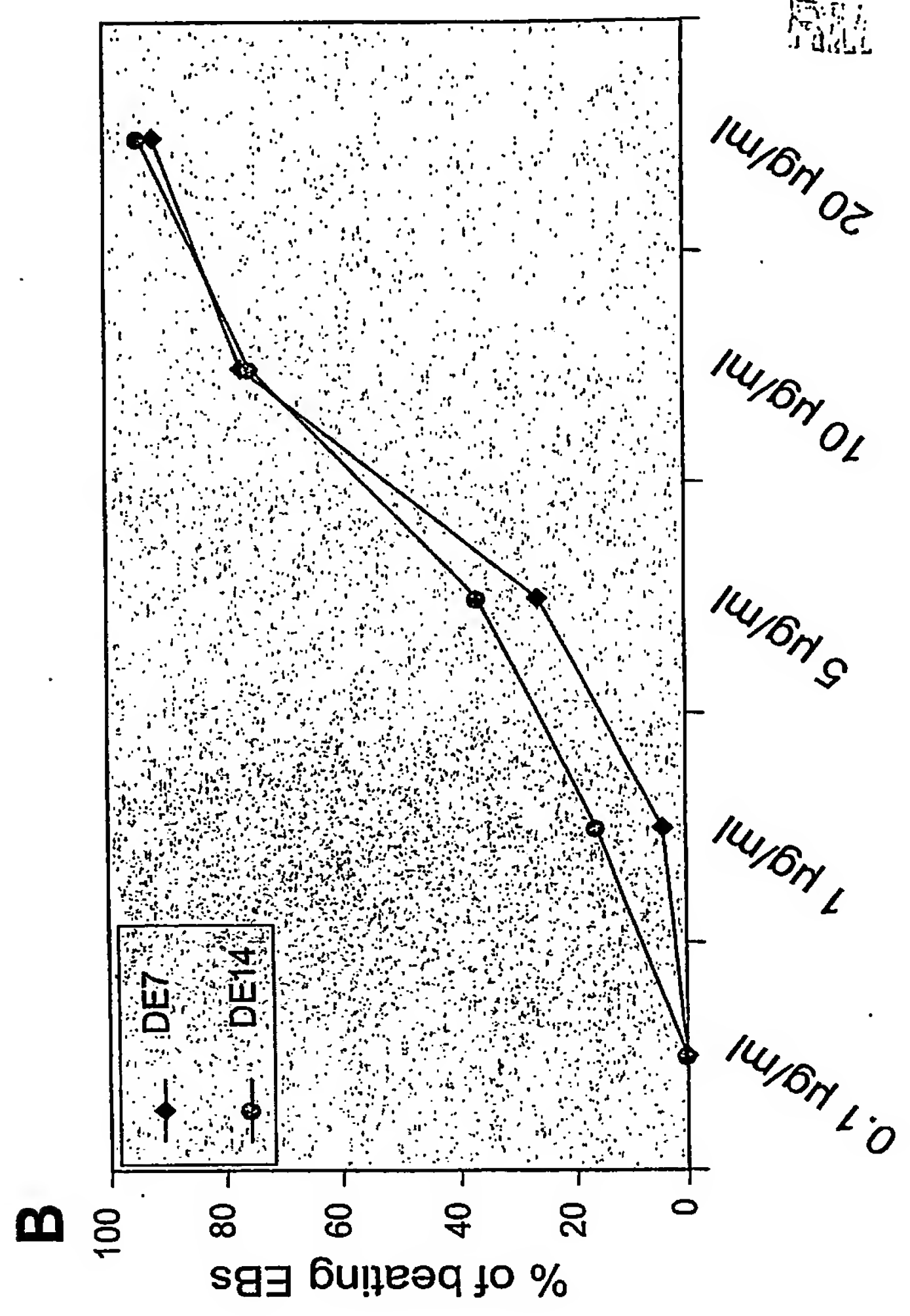
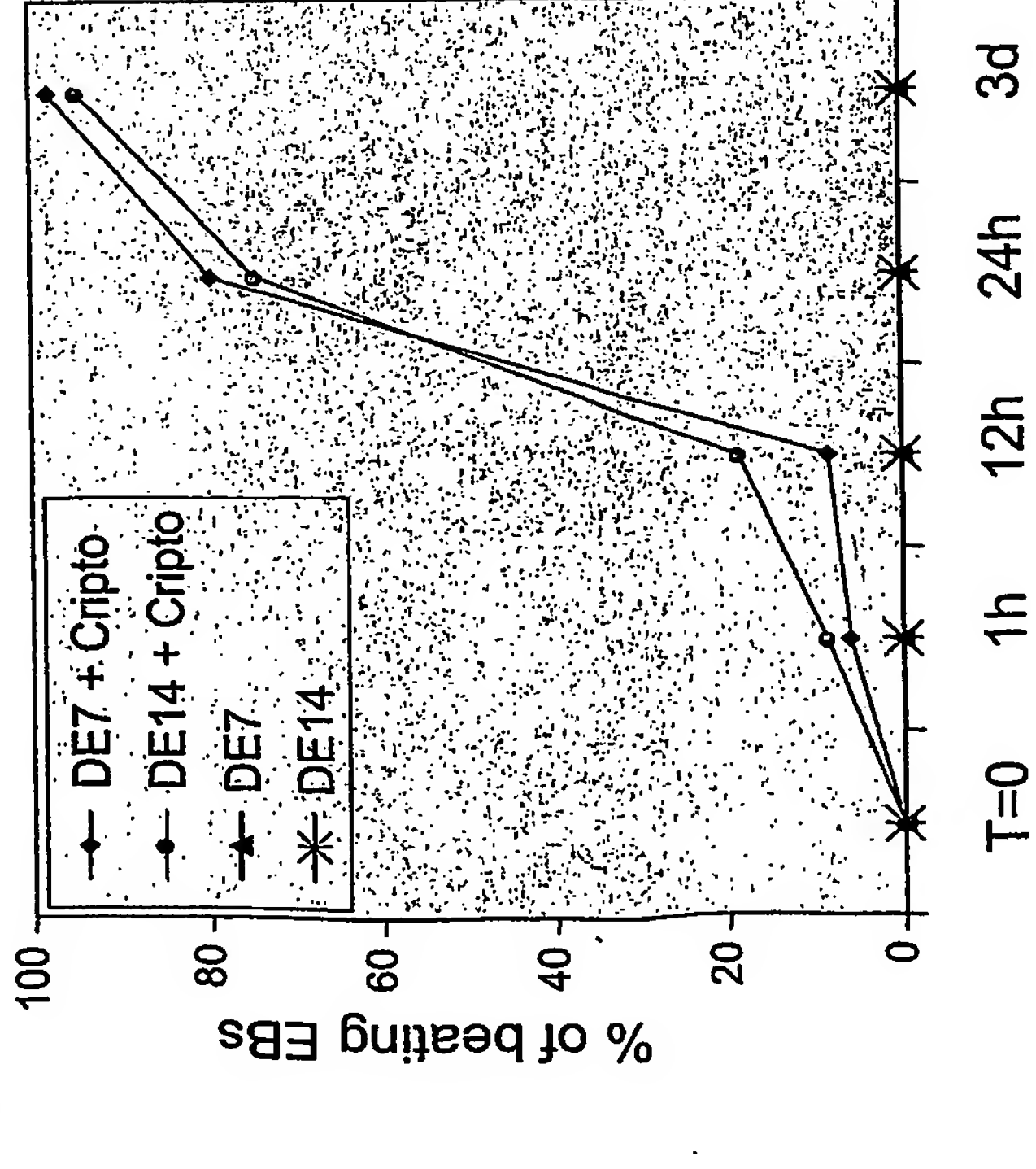
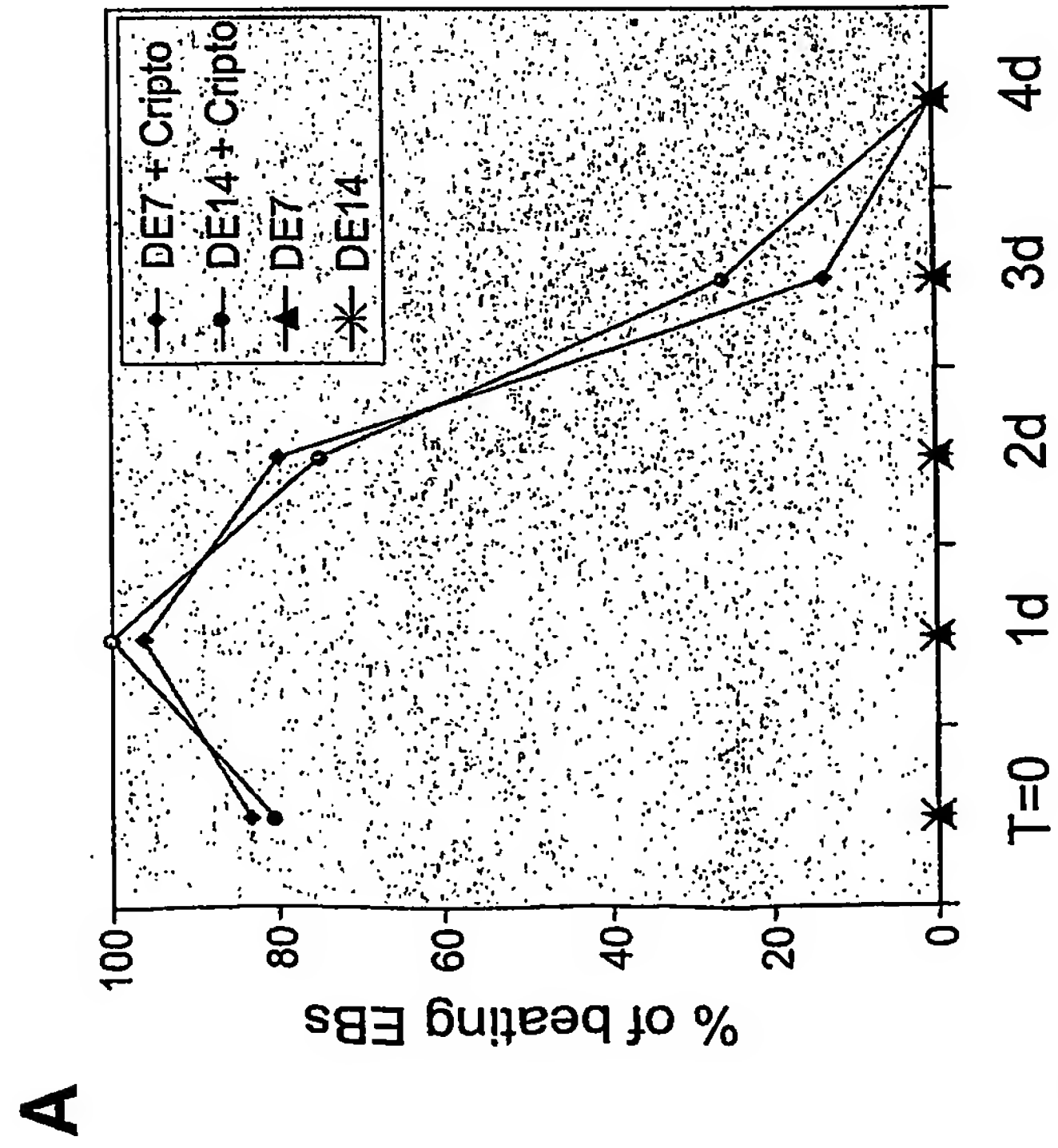


Fig. 4

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)
Olga Capasso

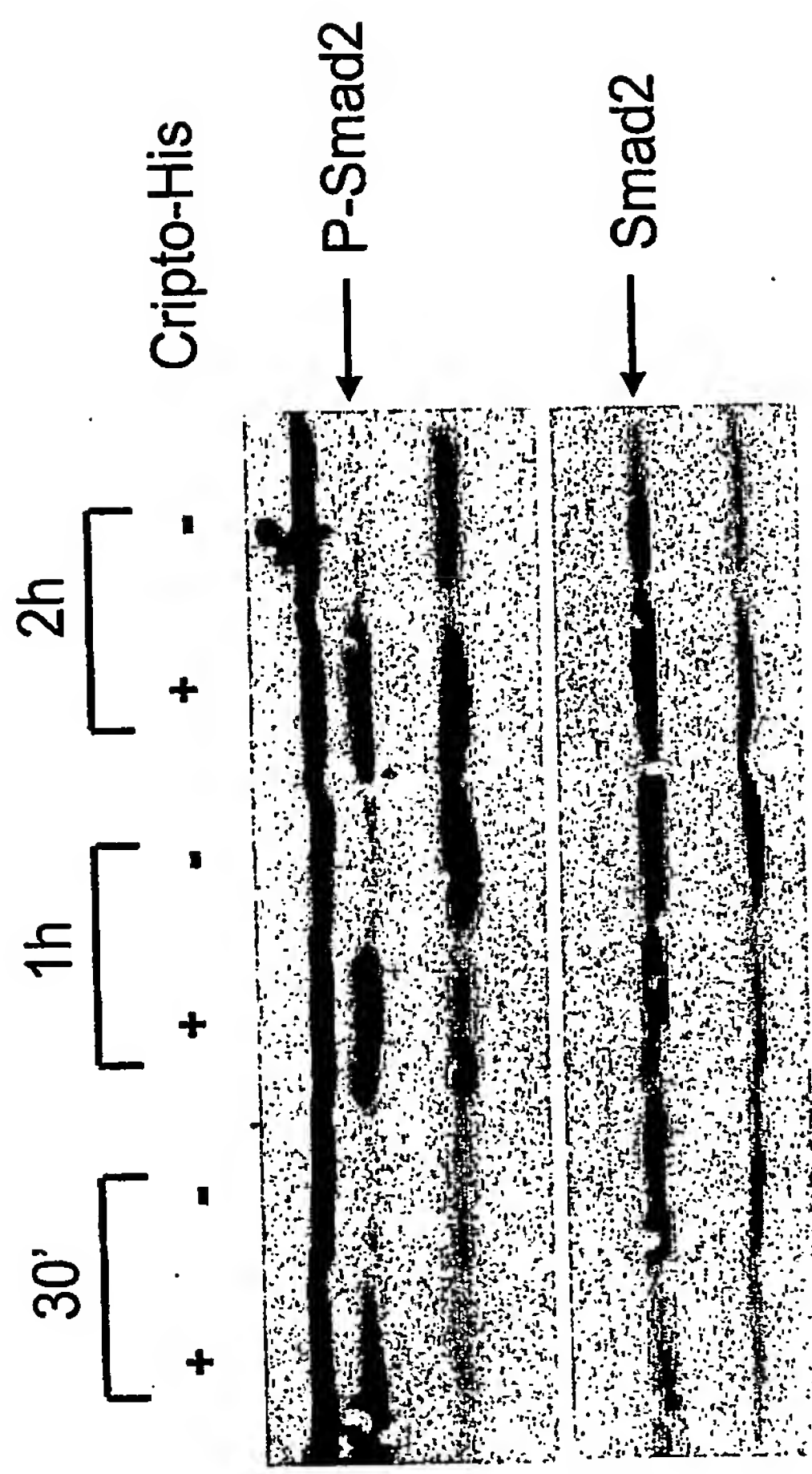


Fig. 5

[Handwritten signature]

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

decepasso

B

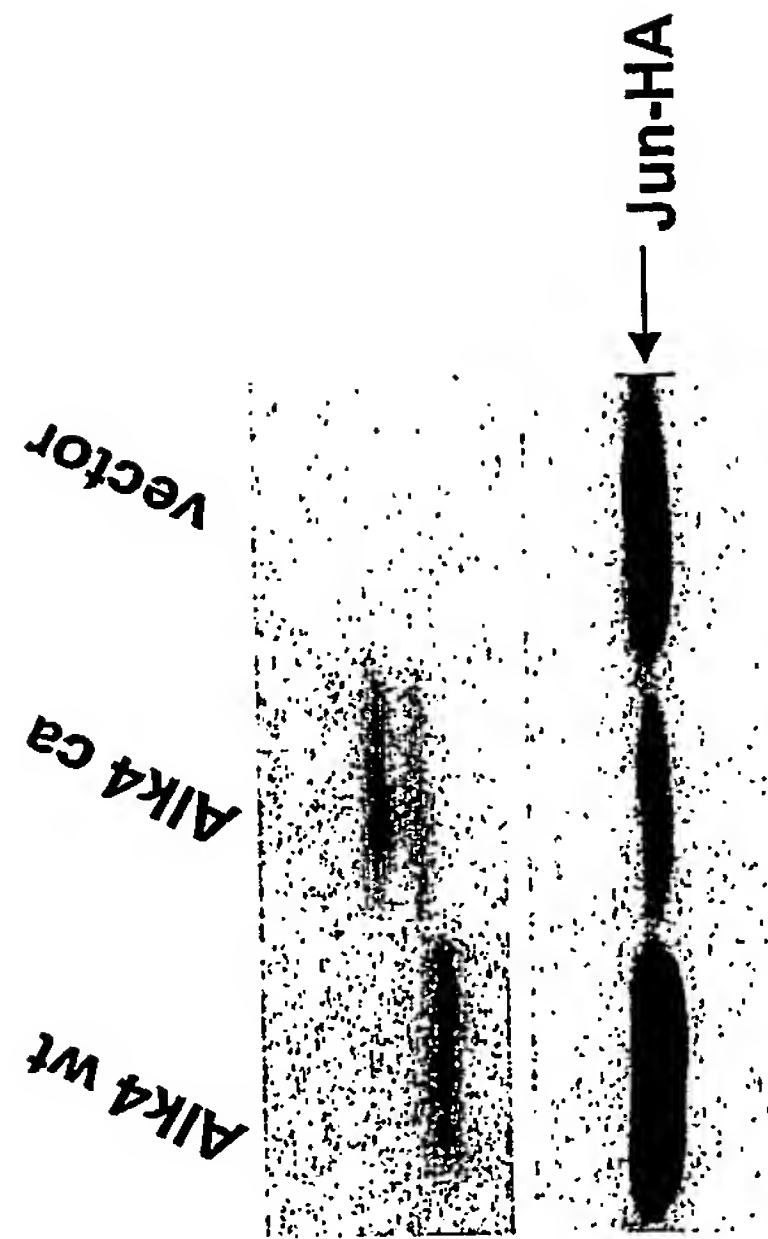
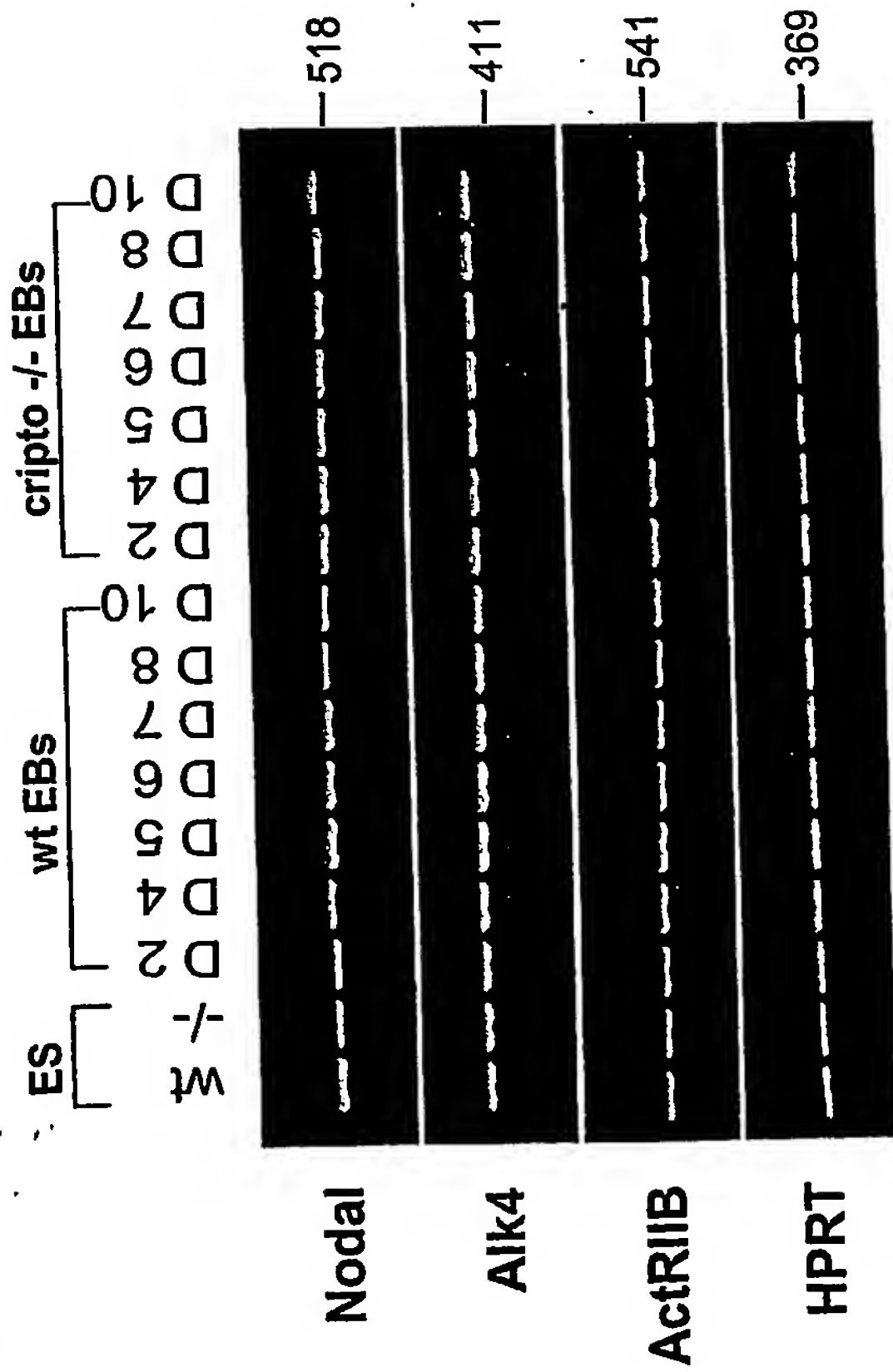


Fig. 6

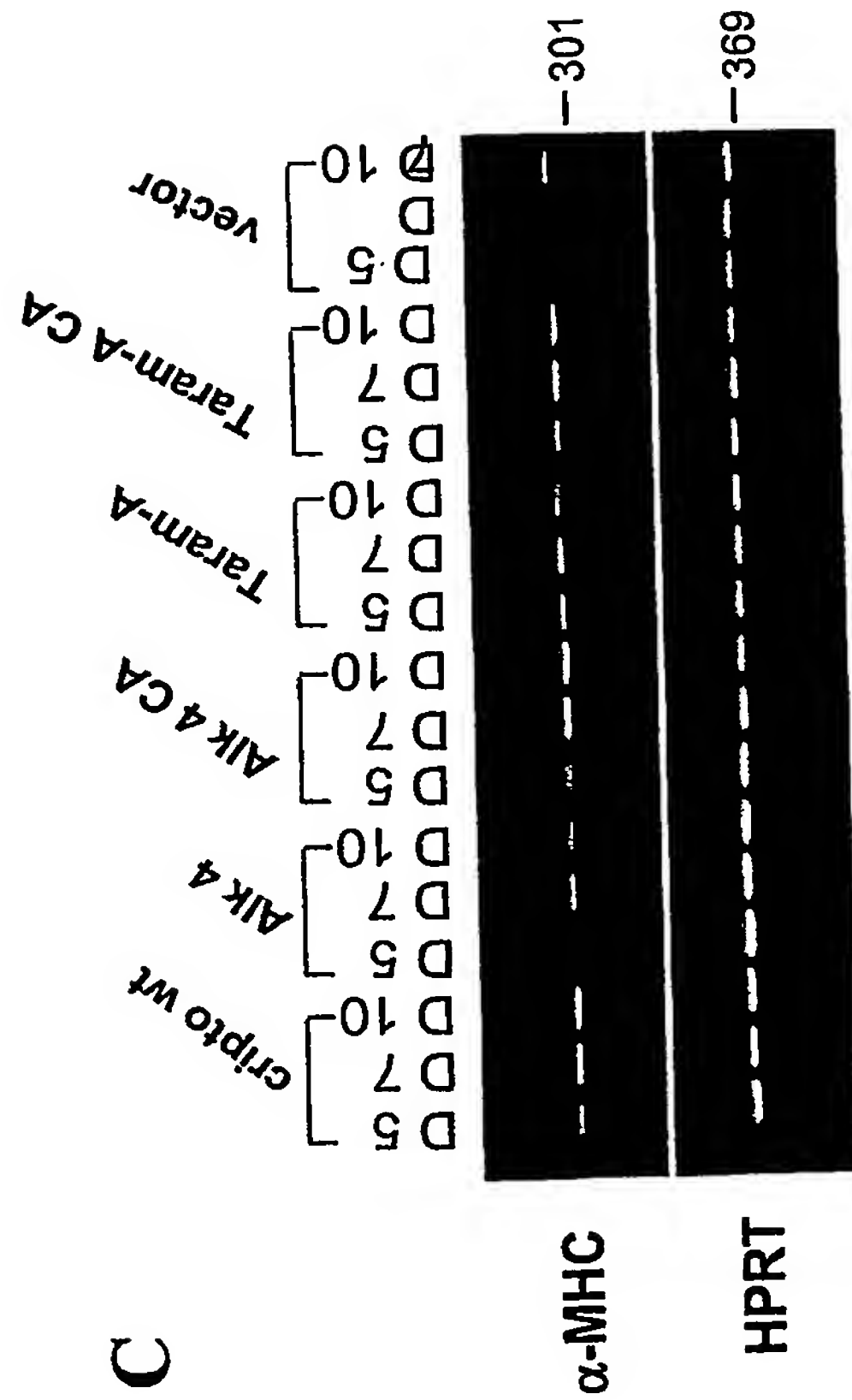
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'istr. 820 B)

Olga Capasso

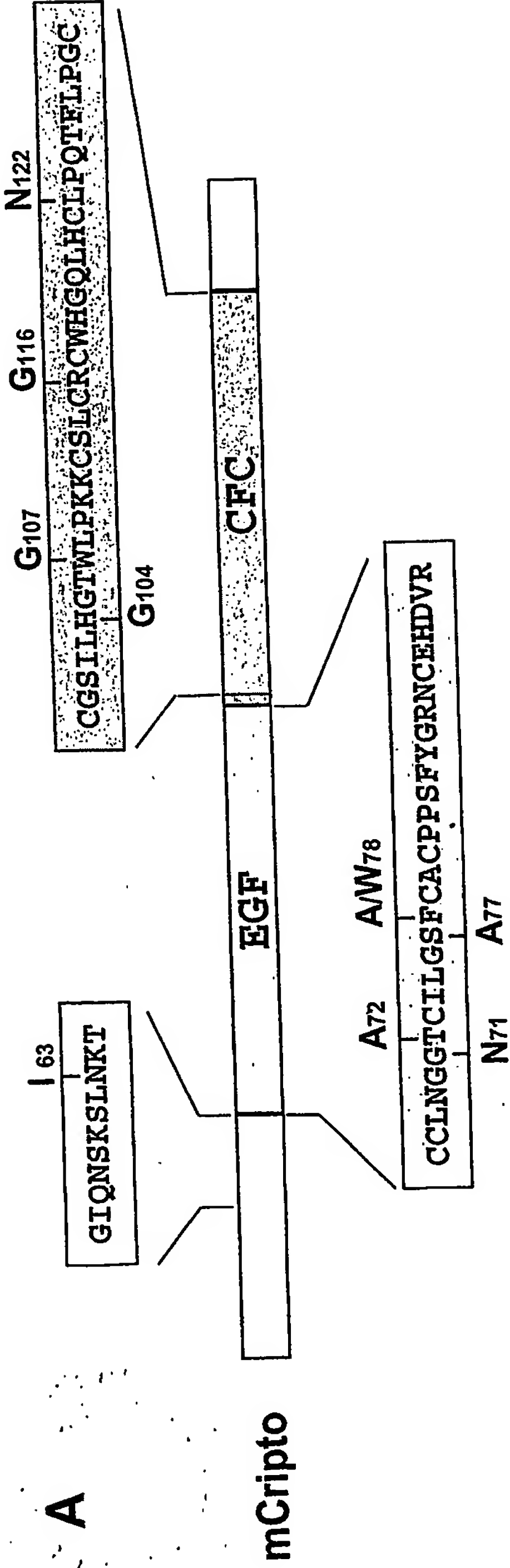
A



C



RM 2002 A 000125



C

vector

W107G

F78A

G71N

Cripto wt

5d, 7d, 10d



Cripto wt

G71N

F78A

F78W

T72A

W107G

vector



[Handwritten signature]

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)
Olga Capasso



Fig. 7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.